

证 明

本证明之附件是向本局提交的下列专利申请副本

申 请 日： 2003. 06. 17

申 请 号： 03142873. 8

申 请 类 别： 发明

发明创造名称： 抗S A R S 疫苗

申 请 人： 深圳市清华源兴生物医药科技有限公司

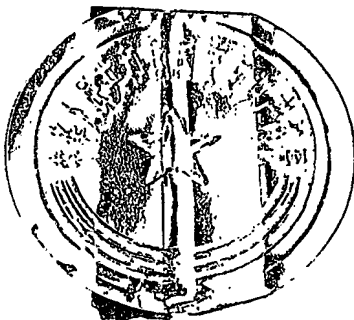
发明人或设计人： 周向军

REC'D 31 AUG 2004

WIPO

PCT

BEST AVAILABLE COPY



PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

中华人民共和国
国家知识产权局局长

王 景 川

2004 年 7 月 9 日

权利要求书

1. 一株 SARS 病毒的全基因组序列, 其包括在 SEQ ID No:1 中列出的核苷酸序列。
2. 一种 DNA 疫苗, 其中包括根据权利要求 1 所述的核苷酸序列或与该核苷酸序列的同源性大于 90% 的序列。
- 5 3. 根据权利要求 2 所述的 DNA 疫苗, 其中包括 SEQ ID No:1、SEQ ID No:2、SEQ ID No:3、SEQ ID No:4、SEQ ID No: 5、SEQ ID No:6 的核酸片段或者与其同源性大于 90% 的核酸片段。
4. 一种蛋白质疫苗, 其中含有权利要求 1-3 中任一项所述的核苷酸序列所编码的蛋白质。
- 10 5. 一种治疗用 RNA 分子, 其与权利要求 1 所述的 SARS 病毒全基因组序列具有互补性, 可以与其结合从而阻止 SARS 病毒的复制、转录或者翻译过程。
6. 一种载体, 包含根据权利要求 1 所述的核苷酸序列。
7. 含有根据权利要求 6 所述的载体的宿主细胞, 其中所述细胞是
15 原核细胞或真核细胞。
8. 根据权利要求 7 所述的宿主细胞, 其中所述的细胞表达 SARS 病毒的有关蛋白质。
9. 核酸探针, 包含至少 15 个核苷酸, 可与含有 SEQ ID No:1 所列的核苷酸序列的核酸序列进行特异杂交。
- 20 10. 根据权利要求 9 所述的核酸探针, 其中所述探针用可探测标记进行标记, 可以用于 SARS 感染的检测。

说明书

抗 SARS 疫苗

技术领域

本发明涉及病毒学领域，具体而言涉及 SARS 冠状病毒基因组的核苷酸序列以及这些序列中的部分片段用于制备 DNA 疫苗，表达相应的蛋白质的用途。也涉及这些蛋白用于疾病预防和治疗的用途。

背景技术

自从 2002 年 11 月在我国广东省发现第一例严重急性呼吸系统综合症 (SARS) 以来，在过去的半年多的时间里，全球感染人数和地区不断增加。根据来自世界卫生组织网站的数据，截至 2003 年 6 月 6 日，全球累计报告病例达到 8404 人，遍及 32 个国家和地区，夺去了 779 人的生命。

严重急性呼吸系统综合症是一种新型的传染性很强的呼吸系统疾病，英文名称为 Severe Acute Respiratory Syndrome，简称 SARS。它不同于以往出现的非典型肺炎。以往的非典型肺炎 (Atypical Pneumonia, ATP) 通常是可以治疗的，而且很少有生命危险。而严重急性呼吸系统综合症的传染性很强，而且会产生呼吸窘迫而死亡。对于严重急性呼吸系统综合症的病原研究发现了一种新的冠状病毒，并命名为 SARS 冠状病毒。

冠状病毒最先于 1937 年从鸡身上分离出来。于 1968 年由一个叫秦瑞的科学家在电子显微镜下发现冠状病毒的外膜呈日冕状或者皇冠状突起，由此命名为“冠状病毒”。

1975 年病毒命名委员会正式命名了冠状病毒科。根据病毒的血清学特点和核苷酸序列的差异，目前冠状病毒分为冠状病毒和环曲病毒两个属。

冠状病毒科的分类：

代表株为禽传染性支气管炎病毒 (Avian infectious bronchitis virus, IBV)

其它成员有：

人冠状病毒 (Human coronavirus)

鼠肝炎病毒 (Murine virus hepatitis, MHV)

猪血凝性脑脊髓炎病毒 (Porcine hemagglutinating encephalomyelitis)

virus)

猪传染性胃肠炎病毒 (Porcine transmissible gastroenteritis virus, TGEV)

新生犊腹泻冠状病毒 (Neonatal calf diarrhea coronavirus, BCV)

大鼠冠状病毒 (Rat coronavirus, RCV)

火鸡蓝冠病毒 (Turkey bluecomb virus)

猫传染性腹膜炎病毒 (Feline infectious peritonitis virus)

可能成员有:

犬冠状病毒 (Canine coronavirus)

大鼠涎腺炎病毒 (Sialodacryoadenitis virus of rat)

人肠道冠状病毒 (Human enteric coronavirus)

冠状病毒的理化特征: 冠状病毒大约 60-220 纳米直径, 外形呈皇冠状, 故称为冠状病毒。冠状病毒由单一的核糖核酸 (RNA) 构成, 这种 RNA 和 N 蛋白共同组成病毒。其遗传物质是 RNA, 有三个结构蛋白, 属糖蛋白。它的特点是, RNA 和 RNA 之间重组率非常高, 出现变异正是由于这种很高的重组率。重组后, RNA 变了, 其序列发生了变化; 蛋白也变了, 蛋白的氨基酸序列也变了。

冠状病毒的流行病学: 到目前为止, 大约 15 种不同冠状病毒株被发现, 有些可使人发病, 另一些可使牛, 猪, 鼠, 猫, 狗和鸟类发病, 特别是鸡瘟疫和犬瘟疫。犬瘟疫表现为一种急性胃肠道传染病, 其临床特征为腹泻。病原是冠状病毒, 主要存在于病犬的胃肠道内, 并随粪便排出, 污染饲料和周围环境。因此, 犬冠状病毒主要经消化道感染。病毒对外界环境的抵抗力较强。粪便中的病毒可存活 6~9 天, 污染物在水中可保持数天的传染性。因此, 犬群中一旦发生本病, 很难在短时间内控制其流行和传播。病毒对热敏感, 紫外线、来苏儿、0.1%过氧乙酸及 1%克辽林等都可在短时间内将病毒杀死。

冠状病毒可感染人和家禽、家畜, 可引起家禽的传染性支气管炎、鼠肝炎、猪脑脊髓炎、猫传染性腹膜炎等。冠状病毒引起的人类疾病有两类, 首先是呼吸道感染, 其次是肠道感染。

对冠状病毒的病毒分离工作难度很大, 需用人胚胎细胞、气管及鼻粘膜细胞, 经器官培养方能分离。增殖病毒亦很困难, 也要用上述材料。

该病毒对温度很敏感，33℃生长良好，35℃就受到抑制。由于这个特性，由它引起的疾病流行多发生在冬季和早春季节。

对冠状病毒目前尚无特异的预防和治疗药物。

特异性预防，即针对性预防措施应当是疫苗。疫苗的研制是有可能的，但需要时间较长，解决病毒繁殖问题是其难题。

非特异性预防措施即卫生部已公布的预防春季呼吸道传染病措施，如保暖、洗手、通风、勿过度疲劳及勿接触病人，少去人多的公共场所等。治疗主要是对症治疗。冠状病毒感染在全世界非常普遍，人群中普遍存在冠状病毒抗体，成年人高于儿童。各国报道的人群抗体阳性率不同，我国人群以往冠状病毒中和抗体阳性率在30%至60%。呼吸道冠状病毒感染通过空气飞沫传播，感染高峰在秋冬和早春。有报道认为不同病毒的流行有不同的周期性，一般间隔2至3年流行一次。冠状病毒感染引起的免疫应答较差，再次感染较常见。

冠状病毒的临床特点：冠状病毒是成人普通感冒的主要病原之一，在儿童可以引起上呼吸道感染，一般很少波及下呼吸道。冠状病毒感染的潜伏期一般为2至5天，平均为3天。典型的冠状病毒感染呈流涕、不适等感冒症状。不同型别病毒的致病力不同，引起的临床表现也不尽相同，OC43株引起的症状一般比229E病毒严重。有报道冠状病毒感染可以出现发热、寒战、呕吐等症状。病程一般在1个星期左右，临床过程轻微，没有后遗症。

冠状病毒还可以引起婴儿、新生儿急性肠胃炎，主要症状是水样大便、发热、呕吐，每天10余次，严重者可以出现血水样便。

文献报告冠状病毒的感染可以产生以下临床症状：

- 1) 呼吸系统感染，包括重症急性呼吸系统综合症（SARS）；
- 2) 肠道感染（婴儿偶尔发生）；
- 3) 神经系统症状（很少）。

冠状病毒通过呼吸道分泌物排出体外，经口液、喷气、接触传染。临床上，多数冠状病毒引起轻度和自愈性疾病，但少数可有神经系统并发症。

2003年4月16日，世界卫生组织正式确认引起SARS的病原体是冠状病毒的一个变种，将其命名为“SARS冠状病毒”。它与流感病毒有亲缘关系，但又非常独特，从前从未在人类身上发现。如前所述，冠状病毒是一类直径为80~220纳米的球状正链RNA囊膜病毒。其囊膜上有形状类

似日冕的棘突，故命为冠状病毒。进一步研究表明，囊膜上一般有两种糖蛋白：S 蛋白，M 蛋白。其中 S 蛋白负责诱导病毒囊膜与宿主细胞膜的膜融合，激发机体产生中和抗体的体液免疫和细胞免疫反应。病毒内包有病毒的遗传物质 RNA，长约 26~32kb，在所有 RNA 病毒中是最长的。另有核衣壳蛋白，称为 N 蛋白，它与病毒 RNA 的复制和出芽有关。当冠状病毒进入到宿主细胞中，首先翻译合成病毒的 RNA 聚合酶。在 RNA 聚合酶的指导下完成病毒感染的早期事件，进而实现病毒的转录、复制、翻译和新病毒的组装。基因组包含了数目不等的开放阅读框(Open Reading Frame, ORF)，在各个 ORF 之间有基因重叠区或基因间隔区。在所有的冠状病毒基因结构中，基因顺序是一致的：5'-RNA 聚合酶基因-S 蛋白基因-E 蛋白基因-M 蛋白基因-N 蛋白基因-3'，SARS 冠状病毒也不例外。但此病毒与已知的冠状病毒又有很大的不同。冠状病毒可引起人和许多动物的呼吸道、消化道、肝脏和神经系统产生疾病，根据病毒的血清学特性和核苷酸序列的同源性将冠状病毒分为 3 群：群一包括人呼吸道冠状病毒 229E、猪传染性胃肠炎病毒、猫肠道冠状病毒和犬冠状病毒等；群二的成员有人呼吸道冠状病毒 OC43、牛冠状病毒、猪凝血性脑脊髓炎病毒等；群三含有禽传染性支气管炎病毒等。将 SARS 冠状病毒的基因序列与已知的 3 个病毒群进行比较，并绘制几种重要的结构蛋白的系统进化树，发现 SARS 病毒与其他群中的任何一个都不紧密相关。

作为一种烈性传染病的病原体的 SARS 冠状病毒变异很快，研究该病原体的遗传信息、结构和增殖周期对于制备疫苗和设计寻找药物十分重要，也迫切需要诊断用试剂和方法。

发明内容

本发明的发明人测定了一种 SARS 冠状病毒的病毒株的基因组序列，也提供了这种序列的一些用途。

该基因组含有的核苷酸数目为 29745 个，表示在 SEQ ID NO:1。根据生命科学的研究进展，齐头并进，设计与开发出针对 SARS 病毒的蛋白，核酸或小分子药物和疫苗。利用该基因组所提供的信息设计用于检测的探针和试剂盒。

在本发明的一个实施方案中，发现了六个片断编码的多肽或者蛋白可以在体内激发针对 SARS 冠状病毒的免疫反应，所以将这些片断可以作为

DNA 疫苗使用。对于本发明所述的 DNA 疫苗，其中 SEQ ID NO:1 的核苷酸序列，也可以包括与该核苷酸序列的同源性大于 90% 的序列，优选是包括选自 SEQ ID No:2、SEQ ID No:3、SEQ ID No:4、SEQ ID No:5、SEQ ID No:6 和 SEQ ID No:7 的核酸片段或者与其同源性大于 90% 的核酸片段。

在本发明的另一个实施方案中，提供了一种蛋白质疫苗，其中含有序列 SEQ ID No:2、SEQ ID No:3、SEQ ID No:4、SEQ ID No:5、SEQ ID No:6 和 SEQ ID No:7 所编码的蛋白质。

在又一个实施方案中，是基于 SEQ ID No:1 所设计的 DNA 片断或者 RNA 片断，它们可以作为诊断用探针，也可以作为基因芯片的组成部分使用。更进一步而言，或是治疗用分子，比如反义 RNA 分子，其与本发明公开的 SARS 病毒全基因组序列相同或者具有互补性，也可以与本发明公开基因组序列部分相同或者互补，比如在 SEQ ID No:2、SEQ ID No:3、SEQ ID No:4、SEQ ID No:5、SEQ ID No:6 和 SEQ ID No:7 中所表示的片断。依据本发明的基因组信息设计可以与其结合从而阻止 SARS 病毒的复制、转录或者翻译过程的各种核酸分子或其片断，以及将设计的核酸分子或其片断插入各种载体进行表达或者直接使用均包括在本发明之中。

在一个实施方案中，本发明所述核苷酸序列被插入载体中。载体的种类不加限制。载体可以导入宿主细胞中，其中所述细胞是原核细胞或真核细胞。进一步而言，宿主细胞表达 SARS 病毒的有关蛋白质。核酸探针，包含至少 15 个核苷酸，可与含有 SEQ ID No:1 所列的核苷酸序列的核酸序列进行特异杂交。

进一步而言，本发明的核酸探针可以用可探测标记进行标记，可以用于 SARS 感染的检测，提高了检测的灵敏性。

本发明的基因组测序将有助于人类和潜在的动物宿主中的 SARS 病毒感染的诊断（使用 PCR 和免疫试验），有助于抗病毒药物的开发（包括中和抗体），并且有助于鉴定用于疫苗开发的推定的抗原决定簇。基因组信息也有助于制备基因芯片，用于检测和诊断。

发明详述

目的：对在 2003 年 1 月发病及后死亡的非典型肺炎病人进行第一例尸解病理研究，确定死亡原因，并进行病原学研究。方法：对非典型肺炎死亡病人进行尸体解剖，病变组织进行超薄切片电镜观察，对病变组织抽提

总 RNA 合成 cDNA, 并测定 SARS 冠状病毒全基因组序列。结果: 尸解检查观察到肺组织广泛性实变, 肺水肿, 肺出血, 肺灶性出血性梗死。病变肺组织超薄切片电镜观察到病毒颗粒存在于 II 型肺泡上皮细胞内。序列测定检出完整的 SARS 冠状病毒全基因组序列(序列命名为 GZ02102003), 经与其它所有 GeneBank 登录的 SARS 冠状病毒全序列比对, 该序列除存在少量的 SNP 外, 还多出一段 29 个核苷酸序列(CCTACTGGTTACCAACCTGAATGGAATAT), 这 29 个核苷酸序列仅存在于 GZ01 毒株而其它从人体分离到的毒株均无(现已证明 GZ01 与 GZ02102003 来源于同一病人标本)。但有资料显示, 这段序列也存在于从野生动物果子狸检出的 SARS 冠状病毒基因序列中。这 29 个核苷酸序列的存在完全改变了 ORF10 和 ORF11 的蛋白编码框。结论: 该病人死于 SARS 冠状病毒导致的呼吸及循环功能衰竭。其毒株是目前所能找到的最早的 SARS 毒株序列分析表明, 该毒株多出的 29 个核苷酸也存在于果子狸 SARS 病毒中, 而从 2003 年 3 月后发病的病人体内检出的 SARS 冠状病毒均丢失了上述的 29 个核苷酸序列, 据此, 我们相信人类所感染的 SARS 病毒来源于果子狸。

严重急性呼吸综合征(severe acute respiratory syndrome, SARS)于 2003 年二月初暴发于中国广东地区, 随后迅速流行至 32 个国家和地区, 感染人数超过 8400, 死亡人数超过 790, 至今仍没有特效的治序药物和防治疫苗^[1]。SARS 的病原体已被确认为严重急性呼吸综合征冠状病毒(SARS-CoV)^[2, 3]。其全序列测定也已完成^[4, 5]。同时, SARS 冠状病毒已被证实存在于广东居民乐于食用的野生动物果子狸体内^[6]。

我们对一例发病于 2003 年 1 月 31 日并死亡于 2003 年 2 月 10 日的 SARS 患者进行了尸解病理分析和 SARS 冠状病毒的全序列测定。这是目前已知的最早的 SARS 死亡病人的尸解研究。我们的结果显示这一株从 1 月份发病的患者体内分离测定的 SARS 冠状病毒与果子狸 SARS 冠状病毒存在高度的关联性。

材料方法

1.1 病人: 死者女, 62 岁, 广州市居民, 2003 年 1 月 31 日开始发热, 流涕, 咽痛, 咳嗽, 2 月 4 日因病情加重, 出现呼吸困难等症状, 诊断为非典型肺炎随即转院至广州市第八人民医院救治, 病情未见好转, 呼吸困难进一步加重, 于 2003 年 2 月 10 日 0 点 15 分因呼吸心跳停止死亡。我们于

第二天(2003年2月11日)15点在第一军医大学南方医院对尸体进行了病理学解剖。

1.2 电镜检查

将肺组织用1%锇酸固定30分钟,PBS洗涤后用梯度丙酮脱水,环氧树脂包埋。超薄切片后用铀铅双重染色,电镜观察。

1.3 病毒全序列测定与分析

1.3.1 总RNA的提取 使用美国Invitrogen公司TRIZOL Reagent试剂盒。参照试剂盒使用说明进行。

1.3.2 cDNA合成和全序列测定 用ThermoScript (Invitrogen, USA)和随机引物合成cDNA。根据已公开的SARS冠状病毒全序列设计覆盖SARS病毒全基因的PCR引物,每对PCR引物扩增约1kb长的产物,相邻引物对有约200碱基长的重叠区。PCR反应为39个循环25 ul总体积,反应条件为前14个循环退火温度每循环下降0.5°C。PCR产物的测序使用ABI Big Dye Terminator 试剂在ABI377机器上进行。所测定序列的组合使用源于University of Washington的“Phred, Phrap and Consed”程序。

结果

2.1 大体解剖 肺组织广泛性实变(尤以左肺上叶下部,下叶,右肺全肺为重)肺水肿,肺出血,肺灶性出血性梗死。病变的肺组织呈脱屑性间质性肺炎改变,实变的肺泡腔内充满大量脱落和增生的肺泡上皮、水肿液、肺泡隔及肺泡腔内见数量不等的单核巨噬细胞及淋巴细胞浸润,部分肺泡腔内、胸膜可见中性粒细胞浸润。双肺肺泡腔内广泛性透明膜形成伴局灶性肺泡壁坏死。部分肺泡上皮内检见病毒包涵体。肺支气管上皮脱落,部分小支气管壁内及周围见有淋巴细胞、单核细胞及中性粒细胞浸润。肺间质充血,出血,毛细血管扩张,腔内含单核细胞、淋巴细胞和中性粒细胞,肺间质小动脉及小静脉内皮细胞肿胀、增生,内皮下水肿,血管中膜及外膜可见单核细胞及淋巴细胞浸润,部分小血管内可见透明血栓。肺门淋巴结内血管高度扩张充血,皮、髓质分界不清,副皮质区有较多的单核样细胞,髓质内淋巴组织减少。胸腔积血200ml,肺动脉主干血栓形成。

2.2 电镜检查

电镜结果显示,在II型肺泡上皮细胞内可见冠状病毒样颗粒(见图1)。

2.3 序列测定与分析

我们测定的 SARS 冠状病毒序列全长为 29745 碱基, 命名为 GZ02102003, 以指明该序列是从一位死亡于 2003 年 2 月 10 日的患者肺组织标本中检出。经与 GeneBank 上登录的其它 SARS 冠状病毒全序列进行比对^[7], 发现该序列除存在少量的 SNP 外, 多出一段 29 个核苷酸序列 (CCTACTGGTTACCAACCTGAATGGAATAT), 该段序列仅存在于 GZ01 毒株而其它毒株均无。这段序列的存在完全改变了 ORF10 和 ORF11 的蛋白编码框, 同时这段序列也存在于从野生动物果子狸检出的 SARS 冠状病毒。17 株病毒序列 SNP 的结果见表 1 所示。需要指出的是, 我们在独立完成了 GZ02102003 的全序列测定后了解到 GZ01 序列的病毒也是来源于同一患者的标本。

表 1. 17 株 SARS 冠状病毒全序列比对

Table 1. **Sequence comparisons of the 17 SARS-CoV genomes.** Only the non-synonymous variants are shown. The frequency of each variant nucleotide is presented. The position of each nucleotide is based on the TOR2 SARS-CoV sequence. The amino acid substitutions and the corresponding protein or open reading frames (ORF) are indicated.

TOR2	473	494	502	509	652	937	1180	1206	1384	1476	2601	3165	3274	3326	3626	4220	4250	4876	4952	5251	5427	5547	5591	5594
CUHK-SU10	T	T	A	G	G	A	G	T	C	A	T	A	A	T	T	A	T	T	T	C	A	A	A	A
SIN2748	T	T	A	G	G	A	G	T	C	A	T	A	A	T	T	A	T	T	T	C	A	A	A	A
SIN2500	T	T	A	G	G	A	G	T	C	A	T	A	A	T	T	A	T	T	T	C	A	A	A	A
HKU-39849	T	T	A	G	G	A	G	T	C	A	C	A	A	T	T	A	T	T	T	C	A	A	A	A
Urbani	T	T	A	G	G	A	G	T	C	A	T	A	A	T	T	A	T	T	T	C	A	A	A	A
TW1	T	T	A	G	G	A	G	T	C	A	T	G	A	T	T	A	T	T	T	C	A	A	A	A
SIN2677	T	T	A	G	G	A	G	T	C	G	T	A	A	T	T	A	T	T	T	C	A	A	A	A
SIN2774	T	T	A	G	G	A	G	T	C	A	T	A	A	T	T	A	T	T	T	C	A	A	A	A
ZJ01	G	A	T	G	G	A	G	T	M	A	T	A	A	T	T	A	T	T	T	C	A	A	A	A
SIN2679	T	T	A	G	G	A	G	T	C	A	T	A	A	T	T	A	T	T	T	C	A	A	A	A
BJ01	T	T	A	G	G	A	G	T	C	A	T	A	A	T	T	A	T	T	T	C	A	A	A	A
BJ03	T	T	A	G	G	A	G	T	C	A	T	A	C	T	T	A	T	T	T	C	C	C	C	C
BJ02	T	T	A	G	G	A	G	T	C	A	T	A	A	T	T	A	T	T	A	C	A	A	A	A
BJ04	T	T	A	G	G	A	T	T	C	A	T	A	A	T	T	A	T	T	T	C	A	A	A	A
CUHK-W1	T	T	A	G	G	A	G	T	C	A	T	A	A	T	T	A	T	T	T	C	A	A	A	A
GZ01	T	T	A	T	A	C	G	T	C	A	T	A	A	T	C	G	C	C	A	C	A	A	A	A
GZ02102003	T	T	A	T	G	A	G	C	C	A	T	A	A	C	C	G	T	T	T	A	A	A	A	A

5681	6148	6612	6929	7643	7665	7702	7731	7746	7919	7930	7954	8387	8417	8502	8559	8562	8573	8816	8947	9096	9177	9332	9333	9405	9488
G	T	G	G	C	T	C	C	G	C	G	T	G	G	T	T	G	G	C	T	C	C	T	C	T	T
G	T	G	G	C	T	C	C	G	C	G	T	G	G	T	T	G	G	C	T	C	C	T	C	T	T
G	T	G	G	C	T	C	C	G	C	G	T	G	G	T	T	G	G	C	T	C	C	T	C	T	T
G	T	G	G	C	T	C	C	G	C	G	T	G	G	T	T	G	G	C	T	C	C	T	C	T	T
G	T	G	G	C	T	C	C	G	C	A	T	C	C	T	T	G	G	C	T	C	C	T	C	T	T
G	T	G	G	C	T	C	C	G	F	G	T	G	G	T	T	G	G	C	T	C	C	T	C	T	T
G	T	G	G	C	T	C	C	G	C	G	T	G	G	T	T	G	G	C	T	C	C	T	C	T	T
G	T	G	G	C	T	C	C	G	C	G	T	G	G	T	T	G	G	C	T	C	C	T	C	T	T
G	T	G	G	C	T	C	C	G	C	G	T	G	G	T	T	G	G	C	T	C	C	T	C	T	T
G	T	G	G	C	T	C	C	G	C	G	T	G	G	T	T	G	G	C	T	C	C	T	C	T	T
G	T	G	G	C	T	C	C	G	C	G	T	G	G	T	T	G	G	C	T	C	C	T	C	T	T
G	T	G	G	C	T	C	C	G	C	G	T	G	G	T	T	G	G	C	T	C	C	T	C	T	T
G	T	G	G	C	T	C	C	G	C	G	T	G	G	T	T	G	G	C	T	C	C	T	C	T	T
G	T	G	G	C	T	C	C	G	C	G	T	G	G	T	T	G	G	C	T	C	C	T	C	T	T
G	T	G	G	C	T	C	C	G	C	G	T	G	G	T	T	G	G	C	T	C	C	T	C	T	T
G	T	G	G	C	T	C	C	G	C	G	T	G	G	T	T	G	G	C	T	C	C	T	C	T	T
G	T	G	G	C	T	C	C	G	C	G	T	G	G	T	T	G	G	C	T	C	C	T	C	T	T
G	T	G	G	C	T	C	C	G	C	G	T	G	G	T	T	G	G	C	T	C	C	T	C	T	T
G	T	G	G	C	T	C	C	G	C	G	T	G	G	T	T	G	G	C	T	C	C	T	C	T	T
G	T	G	G	C	T	C	C	G	C	G	T	G	G	T	T	G	G	C	T	C	C	T	C	T	T
G	T	G	G	C	T	C	C	G	C	G	T	G	G	T	T	G	G	C	T	C	C	T	C	T	T
G	T	G	G	C	T	C	C	G	C	G	T	G	G	T	T	G	G	C	T	C	C	T	C	T	T
G	T	G	G	C	T	C	C	G	C	G	T	G	G	T	T	G	G	C	T	C	C	T	C	T	T
G	T	G	G	C	T	C	C	G	C	G	T	G	G	T	T	G	G	C	T	C	C	T	C	T	T
G	T	G	G	C	T	C	C	G	C	G	T	G	G	T	T	G	G	C	T	C	C	T	C	T	T
G	T	G	G	C	T	C	C	G	C	G	T	G	G	T	T	G	G	C	T	C	C	T	C	T	T
G	T	G	G	C	T	C	C	G	C	G	T	G	G	T	T	G	G	C	T	C	C	T	C	T	T
G	T	G	G	C	T	C	C	G	C	G	T	G	G	T	T	G	G	C	T	C	C	T	C	T	T
G	T	G	G	C	T	C	C	G	C	G	T	G	G												

[illegible]

[illegible]

[illegible]

22213	C	T	G	A	A	C	T	C	G	C	T	C	G	A	G	T	A	A	G	T	25579
22228	C	T	G	A	A	C	T	C	T	C	T	C	G	A	G	T	A	A	G	T	25578
22248	C	T	G	A	A	C	T	C	T	C	T	C	G	A	G	T	A	A	G	T	25577
22263	C	T	G	A	A	C	T	C	T	C	T	C	G	A	G	T	A	A	G	T	25576
22278	C	T	G	A	A	C	T	C	T	C	T	C	G	A	G	T	A	A	G	T	25575
22293	C	T	G	A	A	C	T	C	T	C	T	C	G	A	G	T	A	A	G	T	25574
22308	C	T	G	A	A	C	T	C	T	C	T	C	G	A	G	T	A	A	G	T	25573
22323	C	T	G	A	A	C	T	C	T	C	T	C	G	A	G	T	A	A	G	T	25572
22338	C	T	G	A	A	C	T	C	T	C	T	C	G	A	G	T	A	A	G	T	25571
22353	C	T	G	A	A	C	T	C	T	C	T	C	G	A	G	T	A	A	G	T	25570
22368	C	T	G	A	A	C	T	C	T	C	T	C	G	A	G	T	A	A	G	T	25569
22383	C	T	G	A	A	C	T	C	T	C	T	C	G	A	G	T	A	A	G	T	25568
22398	C	T	G	A	A	C	T	C	T	C	T	C	G	A	G	T	A	A	G	T	25567
22413	C	T	G	A	A	C	T	C	T	C	T	C	G	A	G	T	A	A	G	T	25566
22428	C	T	G	A	A	C	T	C	T	C	T	C	G	A	G	T	A	A	G	T	25565
22443	C	T	G	A	A	C	T	C	T	C	T	C	G	A	G	T	A	A	G	T	25564
22458	C	T	G	A	A	C	T	C	T	C	T	C	G	A	G	T	A	A	G	T	25563
22473	C	T	G	A	A	C	T	C	T	C	T	C	G	A	G	T	A	A	G	T	25562
22488	C	T	G	A	A	C	T	C	T	C	T	C	G	A	G	T	A	A	G	T	25561
22503	C	T	G	A	A	C	T	C	T	C	T	C	G	A	G	T	A	A	G	T	25560
22518	C	T	G	A	A	C	T	C	T	C	T	C	G	A	G	T	A	A	G	T	25559
22533	C	T	G	A	A	C	T	C	T	C	T	C	G	A	G	T	A	A	G	T	25558
22548	C	T	G	A	A	C	T	C	T	C	T	C	G	A	G	T	A	A	G	T	25557
22563	C	T	G	A	A	C	T	C	T	C	T	C	G	A	G	T	A	A	G	T	25556
22578	C	T	G	A	A	C	T	C	T	C	T	C	G	A	G	T	A	A	G	T	25555
22593	C	T	G	A	A	C	T	C	T	C	T	C	G	A	G	T	A	A	G	T	25554
22608	C	T	G	A	A	C	T	C	T	C	T	C	G	A	G	T	A	A	G	T	25553
22623	C	T	G	A	A	C	T	C	T	C	T	C	G	A	G	T	A	A	G	T	25552
22638	C	T	G	A	A	C	T	C	T	C	T	C	G	A	G	T	A	A	G	T	25551
22653	C	T	G	A	A	C	T	C	T	C	T	C	G	A	G	T	A	A	G	T	25550
22668	C	T	G	A	A	C	T	C	T	C	T	C	G	A	G	T	A	A	G	T	25549
22683	C	T	G	A	A	C	T	C	T	C	T	C	G	A	G	T	A	A	G	T	25548
22698	C	T	G	A	A	C	T	C	T	C	T	C	G	A	G	T	A	A	G	T	25547

[illegible]

509	510	511	512	513	514	515	516	517	518	519	520	521	522	523	524	525	526	527	528	529	530	531	532	533	534	535	536	537	538	539	540	541	542	543	544	545	546	547	548	549	550	551	552	553	554	555	556	557	558	559	560	561	562	563	564	565	566	567	568	569	570	571	572	573	574	575	576	577	578	579	580	581	582	583	584	585	586	587	588	589	590	591	592	593	594	595	596	597	598	599	600								
1001	1002	1003	1004	1005	1006	1007	1008	1009	1010	1011	1012	1013	1014	1015	1016	1017	1018	1019	1020	1021	1022	1023	1024	1025	1026	1027	1028	1029	1030	1031	1032	1033	1034	1035	1036	1037	1038	1039	1040	1041	1042	1043	1044	1045	1046	1047	1048	1049	1050	1051	1052	1053	1054	1055	1056	1057	1058	1059	1060	1061	1062	1063	1064	1065	1066	1067	1068	1069	1070	1071	1072	1073	1074	1075	1076	1077	1078	1079	1080	1081	1082	1083	1084	1085	1086	1087	1088	1089	1090	1091	1092	1093	1094	1095	1096	1097	1098	1099	1100
1101	1102	1103	1104	1105	1106	1107	1108	1109	1110	1111	1112	1113	1114	1115	1116	1117	1118	1119	1120	1121	1122	1123	1124	1125	1126	1127	1128	1129	1130	1131	1132	1133	1134	1135	1136	1137	1138	1139	1140	1141	1142	1143	1144	1145	1146	1147	1148	1149	1150	1151	1152	1153	1154	1155	1156	1157	1158	1159	1160	1161	1162	1163	1164	1165	1166	1167	1168	1169	1170	1171	1172	1173	1174	1175	1176	1177	1178	1179	1180	1181	1182	1183	1184	1185	1186	1187	1188	1189	1190	1191	1192	1193	1194	1195	1196	1197	1198	1199	1200
1201	1202	1203	1204	1205	1206	1207	1208	1209	1210	1211	1212	1213	1214	1215	1216	1217	1218	1219	1220	1221	1222	1223	1224	1225	1226	1227	1228	1229	1230	1231	1232	1233	1234	1235	1236	1237	1238	1239	1240	1241	1242	1243	1244	1245	1246	1247	1248	1249	1250	1251	1252	1253	1254	1255	1256	1257	1258	1259	1260	1261	1262	1263	1264	1265	1266	1267	1268	1269	1270	1271	1272	1273	1274	1275	1276	1277	1278	1279	1280	1281	1282	1283	1284	1285	1286	1287	1288	1289	1290	1291	1292	1293	1294	1295	1296	1297	1298	1299	1300
1301	1302	1303	1304	1305	1306	1307	1308	1309	1310	1311	1312	1313	1314	1315	1316	1317	1318	1319	1320	1321	1322	1323	1324	1325	1326	1327	1328	1329	1330	1331	1332	1333	1334	1335	1336	1337	1338	1339	1340	1341	1342	1343	1344	1345	1346	1347	1348	1349	1350	1351	1352	1353	1354	1355	1356	1357	1358	1359	1360	1361	1362	1363	1364	1365	1366	1367	1368	1369	1370	1371	1372	1373	1374	1375	1376	1377	1378	1379	1380	1381	1382	1383	1384	1385	1386	1387	1388	1389	1390	1391	1392	1393	1394	1395	1396	1397	1398	1399	1400
1401	1402	1403	1404	1405	1406	1407	1408	1409	1410	1411	1412	1413	1414	1415	1416	1417	1418	1419	1420	1421	1422	1423	1424	1425	1426	1427	1428	1429	1430	1431	1432	1433	1434	1435	1436	1437	1438	1439	1440	1441	1442	1443	1444	1445	1446	1447	1448	1449	1450	1451	1452	1453	1454	1455	1456	1457	1458	1459	1460	1461	1462	1463	1464	1465	1466	1467	1468	1469	1470	1471	1472	1473	1474	1475	1476	1477	1478	1479	1480	1481	1482	1483	1484	1485	1486	1487	1488	1489	1490	1491	1492	1493	1494	1495	1496	1497	1498	1499	1500
1501	1502	1503	1504	1505	1506	1507	1508	1509	1510	1511	1512	1513	1514	1515	1516	1517	1518	1519	1520	1521	1522	1523	1524	1525	1526	1527	1528	1529	1530	1531	1532	1533	1534	1535	1536	1537	1538	1539	1540	1541	1542	1543	1544	1545	1546	1547	1548	1549	1550	1551	1552	1553	1554	1555	1556	1557	1558	1559	1560	1561	1562	1563	1564	1565	1566	1567	1568	1569	1570	1571	1572	1573	1574	1575	1576	1577	1578	1579	1580	1581	1582	1583	1584	1585	1586	1587	1588	1589	1590	1591	1592	1593	1594	1595	1596	1597	1598	1599	1600
1601	1602	1603	1604	1605	1606	1607	1608	1609	1610	1611	1612	1613	1614	1615	1616	1617	1618	1619	1620	1621	1622	1623	1624	1625	1626	1627	1628	1629	1630	1631	1632	1633	1634	1635	1636	1637	1638	1639	1640	1641	1642	1643	1644	1645	1646	1647	1648	1649	1650	1651	1652	1653	1654	1655	1656	1657	1658	1659	1660	1661	1662	1663	1664	1665	1666	1667	1668	1669	1670	1671	1672	1673	1674	1675	1676	1677	1678	1679	1680	1681	1682	1683	1684	1685	1686	1687	1688	1689	1690	1691	1692	1693	1694	1695	1696	1697	1698	1699	1700
1701	1702	1703	1704	1705	1706	1707	1708	1709	1710	1711	1712	1713	1714	1715	1716	1717	1718	1719	1720	1721	1722	1723	1724	1725	1726	1727	1728	1729	1730	1731	1732	1733	1734	1735	1736	1737	1738	1739	1740	1741	1742	1743	1744	1745	1746	1747	1748	1749	1750	1751	1752	1753	1754	1755	1756	1757	1758	1759	1760	1761	1762	1763	1764	1765	1766	1767	1768	1769	1770	1771	1772	1773	1774	1775	1776	1777	1778	1779	1780	1781	1782	1783	1784	1785	1786	1787	1788	1789	1790	1791	1792	1793	1794	1795	1796	1797	1798	1799	1800
1801	1802	1803	1804	1805	1806	1807	1808	1809	1810	1811	1812	1813	1814	1815	1816	1817	1818	1819	1820	1821	1822	1823	1824	1825	1826	1827	1828	1829	1830	1831	1832	1833	1834	1835	1836	1837	1838	1839	1840	1841	1842	1843	1844	1845	1846	1847	1848	1849	1850	1851	1852	1853	1854	1855	1856	1857	1858	1859	1860	1861	1862	1863	1864	1865	1866	1867	1868	1869	1870	1871	1872	1873	1874	1875	1876	1877	1878	1879	1880	1881	1882	1883	1884	1885	1886	1887	1888	1889	1890	1891	1892	1893	1894	1895	1896	1897	1898	1899	1900
1901	1902	1903	1904	1905	1906	1907	1908	1909	1910	1911	1912	1913	1914	1915	1916	1917	1918	1919	1920	1921	1922	1923	1924	1925	1926	1927	1928	1929	1930	1931	1932	1933	1934	1935	1936	1937	1938	1939	1940	1941	1942	1943	1944	1945	1946	1947	1948	1949	1950	1951	1952	1953	1954	1955	1956	1957	1958	1959	1960	1961	1962	1963	1964	1965	1966	1967	1968	1969	1970	1971	1972	1973	1974	1975	1976	1977	1978	1979	1980	1981	1982	1983	1984	1985	1986	1987	1988	1989	1990	1991	1992	1993	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000
2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020	2021	2022	2023	2024	2025	2026	2027	2028	2029	2030	2031	2032	2033	2034	2035	2036	2037	2038	2039	2040	2041	2042	2043	2044	2045	2046	2047	2048	2049	2050	2051	2052	2053	2054	2055	2056	2057	2058	2059	2060	2061	2062	2063	2064	2065	2066	2067	2068	2069	2070	2071	2072	2073	2074	2075	2076	2077	2078	2079	2080	2081	2082	2083	2084	2085	2086	2087	2088	2089	2090	2091	2092	2093	2094	2095	2096	2097	2098	2099	2100
2101	2102	2103	2104	2105	2106	2107	2108	2109	2110	2111	2112	2113	2114	2115	2116	2117	2118	2119	2120	2121	2122	2123	2124	2125	2126	2127	2128	2129	2130	2131	2132	2133	2134	2135	2136	2137	2138	2139	2140	2141	2142	2143	2144	2145	2146	2147	2148	2149	2150	2151	2152	2153	2154	2155	2156	2157	2158	2159	2160	2161	2162	2163	2164	2165	2166	2167	2168	2169	2170	2171	2172	2173	2174	2175	2176	2177	2178	2179	2180	2181	2182	2183	2184	2185	2186	2187	2188	2189	2190	2191	2192	2193	2194	2195	2196	2197	2198	2199	2200
2201	2202	2203	2204	2205	2206	2207	2208	2209	2210	2211	2212	2213	2214	2215	2216	2217	2218	2219	2220	2221	2222	2223	2224	2225	2226	2227	2228	2229	2230	2231	2232	2233	2234	2235	2236	2237	2238	2239	2240	2241	2242	2243	2244	2245	2246	2247	2248	2249	2250	2251	2252	2253	2254	2255	2256	2257	2258	2259	2260	2261	2262	2263	2264	2265	2266	2267	2268	2269	2270	2271	2272	2273	2274	2275	2276	2277	2278	2279	2280	2281	2282	2283	2284																

序列分析的一个重要结果是 GZ02102003 和 GZ01 序列所独有的 29 个碱基改变了 ORF10 和 11 的氨基酸编码, 结果如图 2A 和图 2B 所示。

1. 讨论

这是广东第一例(也就是全球第一例)非典型肺炎死亡病人的尸体病理解剖分析。我们的尸体病理解剖结果显示该病人因双肺肺实变, 广泛性脱屑性间质性肺炎改变, 广泛性肺透明膜形成致病人急性呼吸窘迫, 导致呼吸及循环功能衰竭死亡。电镜检查病变肺组织可观察到病毒颗粒存在于 II 型肺泡上皮内(图 1)。我们进一步从病变肺组织标本中分离测定出一株完整的 SARS 冠状病毒的全序列。同时, 病变肺组织经 PCR 及组织化学检查肺炎衣原体、支原体均为阴性。所以我们确认该病人是死于 SARS。

我们采用从该病人的尸解病变肺组织标本中直接建构总 cDNA 并用 SNP 测序方法测定 SARS 冠状病毒的全序列, 目的之一在于检测体内 SARS 冠状病毒是单一株型还是以不同株型(体现为不同的 SNP)的群体型式存在。我们没有观察到 SNP 现象, 但我们认为还不能作出 SARS 冠状病毒在体内是以单株型存在的结论, 因为 GZ02102003 序列和 GZ01 序列之间存在 SNP。如前面指出, GZ01 序列的病毒也是来源于同一病人标本, 虽然该测序用病毒经过体外细胞培养分离, 且测序方法和我们的方法也有不同, 加上可能存在的测序错误, 这些因素都可以解释为什么来源于同一病人的 SARS 冠状病毒序列会有不同的 SNP。我们认为这一问题还需要进一步研究。

本研究最重要的发现在于检测到为这一病人所携带的 SARS 冠状病毒株所独有的 29 个核苷酸序列(CCTACTGGTTACCAACCTGAATGGAATAT, 见表 1)。因为这 29 个核苷酸序列为 GZ02102003 和 GZ01 两个同一标本来源但不同单位不同方法各自独立完成测序的 SARS 冠状病毒全序列所共有, 我们相信它在 SARS 冠状病毒基因组中的存在是真实的。这一发现的重要意义在于以下三个事实: 1) 这一段序列仅存在于我们目前所能找到的最早的 SARS 死亡病人标本中, 其它完成全序列测定的 SARS 冠状病毒均来源于 2003 年 3 月份以后发病的病人且无一例外的丢失了这一段序列(见表 1)。2) 这一段序列的存在完全改变了 ORF10 和 11(见图 2A 和图 2B)。3) 这一段序列同时存在于从野生动物果子狸体内分离到 SARS 冠状病毒(6)。所以我们认为这段序列从果子狸到人体以及在人体上随时间的迁移规律使得我们有理由相信人类所感染的 SARS 病毒来源于果子狸。

参考文献:

- [1] <http://www.who.int/csr/sars/>
- [2] Tsang KW, Ho PL, Ooi GC, et. al. A Cluster of Cases of Severe Acute Respiratory Syndrome in Hong Kong. N Engl J Med. 2003 Apr 1 [epub ahead of print]
- [3] Ksiazek TG, Erdman D, Goldsmith C, et. al. A Novel Coronavirus Associated with Severe Acute Respiratory Syndrome. N Engl J Med. 2003 Apr 10 [epub ahead of print]
- [4] Marra MA, Jones SJ, Astell CR, et al. The Genome sequence of the SARS-associated coronavirus. Science. 2003 May 30;300(5624):1399-404. Epub 2003 May 01. Science
- [5] Rota PA, Rota PA, Oberste MS, Monroe SS, et.al. Characterization of a Novel Coronavirus Associated with Severe Acute Respiratory Syndrome. Science. 2003 May 1 [epub ahead of print] Science
- [6] 管轶, 深圳市政府新闻发表会, 深圳市, 2003 年 5 月 23 日
- [7] 至 2003 年 6 月 6 日止, 共有 17 条 SARS 冠状病毒全序列登录在 GeneBank 上, 其中序列 ZJ01 有多处明显错误, 不能完成序列比对。

附图简述

图 1 是病变肺组织超薄切片电镜观察。

图 2A 是 ORF10 和图 2B 是 ORF11 比较。

图 3 是 PCR 终产物。DNA Marker: 从下到上依次为 1.100bp; 2.250bp; 3.500bp; 4.750bp; 5.1000bp; 6.2000bp; 7.2500bp; 8.5000bp; 9.7500bp; 10.10000bp; 11.15000bp。PCR 片段: 从左到右依次为 S 全长; S1 片断; S2 片断; E 蛋白; M 蛋白; N 蛋白; PXN 片断。

图 4: 质粒 pMD18-T (由 Takara 公司提供)。

图 5: S1、S2、E、M、N、和 X2 的 pMD18-T 克隆图谱。

图 6: pcDNA3.1(+)/(−) 图谱。

图 7: 酶切确认 pcDNA3.1(+)/(−) (S1、S2、E、M、N 和 X2) 克隆。

具体实施方式

下面以实施例的方式对本发明进行说明，但是正如本技术领域的技术人员所理解的那样，这些实施例仅仅用于说明本发明而不是为了限定本发明。本发明仅仅受所附权利要求的限制。

实施例 1. SARS 病毒基因片段的获取

SARS 病毒 RNA 提取

1.1 材料

1.1.2 含 SARS 病毒的肺组织：取自广东省一位因感染 SARS 而死亡的女患者。

1.2.3 TRIZOL Reagent: 购自 GIBCOBRL 公司，为总 RNA 提取试剂盒。

1.2 方法

1.2.1 取冻存于 -80°C 冰箱中的患者肺组织约 100mg，置于洁净的玻璃研钵中研碎。

1.2.2 取出 1ml TRIZOL 试剂置于玻璃研钵中，轻轻吹打，使研碎的肺组织溶于 TRIZOL 试剂后，用 1.5ml 离心管收集。

1.2.3 将离心管置于室温中 5 分钟，向离心管中加入 0.2ml 氯仿，用手剧烈振摇后，再将离心管置于室温中 3 分钟。

1.2.4 4°C 离心 15 分钟，12000g/分钟。

1.2.5 收集离心后含 RNA 的上层水相，加入 0.5ml 异丙醇，室温放置 15 分钟。

1.2.6 4°C 离心 10 分钟，12000g/分钟。

1.2.7 去掉上清，用 75% 的乙醇洗涤 RNA 沉淀物一次。

1.2.8 待 RNA 沉淀物在空气中晾至微干后，加入 50ml 无 RNA 酶污染的无菌水溶解。

cDNA 合成

2.1 材料

2.1.1 cDNA 合成试剂盒：RNA PCR Kit (AMV) Ver.2.1，购自宝生物公司。

2.1.2 SARS RNA：由南方医院感染内科提取。

2.2 方法

2.2.1 反应混合物

MgCl	4.0 μl
缓冲液	2.0 μl

dNTP	2.0 μ l
RNAase 抑制剂	0.5 μ l
Random 引物	1.0 μ l
Orligo dT 引物	1.0 μ l
RNA 模板	1.0 μ l
Transcriptase 酶	1.0 μ l
水	7.5 μ l

2.2.2 反应程序

第 1 步: 37°C 孵育 50 分钟

第 2 步: 50°C 孵育 2 分钟

第 3 步: 37°C 孵育 5 分钟

第 4 步: 重复第 2 步、第 3 步 5 次

第 5 步: 95°C 孵育 3 分钟

PCR 扩增

3.1 材料

3.1.1 PCR 试剂盒: KaTaRa Ex Taq, 购自宝生物公司

3.1.2 cDNA 由本公司自行合成

3.2 方法

3.2.1 反应混合物

10X Ex Taq 缓冲液	1.0 μ l
dNTP 混合物	0.8 μ l
cDNA 模板	1.0 μ l
引物 1	0.5 μ l
引物 22	0.5 μ l
Taq 酶	0.05 μ l
水	6.15 μ l

3.2.2 反应程序

第 1 步: 94°C 孵育 3 分钟

第 2 步: 94°C 孵育 30 秒钟

第 3 步: 58°C 孵育 20 秒钟

第 4 步: 72°C 孵育 40 秒钟 (注: 根据扩增片段的分子量大小, 孵育时间从 40 秒到 4 分钟不等。)

第 5 步：重复第 2 步、第 3 步和第 4 步 34 次

第 6 步：72℃ 孵育 5 分钟。

结果见图 3 中。

实施例 2. SARS 病毒相关抗原基因片段的克隆

一、6 个抗原基因片段的 PCR 扩增

所有的 PCR 引物（见表二）在设计时都带有 ATG start codon，并且所有的 PCR 产物都在 3' 末端有终止子（stop codon），这样就使得所有的片段在克隆到相关的载体后得到有效的表达。这些引物由华大基因上海鼎安生物科技有限公司合成，分别按每个 OD 用 200ul 的 minipore 无菌水溶解后，再稀释 5 倍后当成工作浓度，在 PCR 反应时按 10X 使用。

用 Takara 公司提供的 PCR 试剂盒，PCR 的模板为（pGEM T Easy clones）相应 pGEM-T Easy 的克隆。PCR 反应的条件 1/10 体积的两个引物，10~50ng 的模板，dNTP，1/10 体积的 10 倍 PCR 缓冲液，2 个单位的 Taq 酶，加无菌水至工作体积（10 到 25ul），PCR 的程序为 94° C 4 分钟，然后 94° C 30 秒—58° C 30 秒—72° C 2 分钟 30 秒的 30 个循环，之后再一个 72° C 10 分钟。所做的 PCR 反应均用 Eppendorf 公司的 PCR 机器进行。

所得的 PCR 终产物如图 3 所示。

二、6 个抗原基因片段 pMD18-T 克隆的构建

用 Qiagen 公司提供的 PCR Purification Kit 将以上所得的 PCR 产物分别纯化，继而与 pMD18-T（Takara 公司的 TA 克隆载体，见图 4）按 2:1 到 5:1 范围的摩尔浓度比、10 到 20ul 的总体积、单位连接酶来进行连接，之后转化到 DH5 α 的感受态细胞，继而在有 100ug/ml Ampicillin 和 IPTG/X-gal 的 LB 培养基上挑选白色的菌落，分别将这些菌落用 4ml LB(100ug/ml Ampicillin) 培养后提取质粒（用 Qiagen 公司的 miniprep extraction kit），继而进一步酶切（用 BamHI 和 EcoRI 来切 S1、S2、E、M 和 N 克隆，用 KpnI 和 EcoRI 来切 X2 克隆）来确定所得的克隆是否带有正确大小的插入片段（见图 5）。然后将有正确大小插入片段的克隆送到华大基因上海鼎安生物科技有限公司进行插入片段的测序，最终确定克隆片段的正确与否。

表二: PCR 引物及相应的 PCR 反应的模板和对应的 PCR 产物

PCR 产物	引物	模板
S1 (~1980 bp)	E2-up-1: 5' ACA GGA TCC AAG AAC ATG TTT ATT TTC TTA TT 3' BamHI Start codon E2-down-1: 5' AGA TCT GAA TCT TAT CCA ATA GGA ATG TCG CAC TC 3' BglII EcoRI	李进的 #1 pGEM-T Easy 的克隆
S2 (~1940 bp)	E2-up-2: 5' ATT GGA TCC ACC ATG GGC TGT CTT ATA GGA GCT GAG C 3' BamHI Start codon E2-down-2: 5' ATG GAT CCG AAT TCT GGC TGT GCA GTA ATT GAT CT 3' BamHI EcoRI	李进的 #2 pGEM-T Easy 的克隆
E (~300bp)	E-up: 5' CAA GGA TCC GTT ATG TAC TCA TTC GTT TCG 3' BamHI Start codon E-down: 5' ACA AGA TCT GAA TTC TTT AAG CTC CTC AAC GGT AA 3' BglII EcoRI	李进的 #5 pGEM-T Easy 的克隆
M (~760 bp)	M-up: 5' ACA GGA TCC ATC ATG GCA GAC AAC GGT AC 3' BamHI Start codon M-down: 5' AAC AGA TCT GAA TTC GCA ATC CTG AAA GTC CTC ATA 3' BglII EcoRI	李进的 #4 pGEM-T Easy 的克隆
N (~1315 bp)	N-up: 5' ATT GGA TCC GTC ATG GAC AAT AAC CAG AAT GGA GGA CG 3' BamHI Start codon N-down: 5' AAC AGA TCT GAA TTC ATT CTG CAC AAG AG 3' BglII EcoRI	李进的 #3 pGEM-T Easy 的克隆
X2 (~380bp)	X2-up: 5' ACA CCA TGG AAT TGG ACA TGG CTA TTT CAC CGA AG 3' NcoI Start codon X2-down: 5' CAG GTA CCG GAT CCA ATA TTG CAG CAG TAC GCA C 3' KpnI BamHI	李进的 #6 pGEM-T Easy 的克隆

三、 6 个抗原基因片段 pcDNA3.1 克隆的构建

测序确证后的 S1、S2、E、M 和 N 等 5 个 pMD18-T 克隆, 分别用 BamHI 和 EcoRI 酶切后, 将样品跑电泳将插入的克隆片段和 pMD18-T 分离开, 并用 Qiagen 公司的 gel extraction kit 来分离纯化相应的插入片段

5 S1、S2、E、M 和 N, 最后将这些片段分别克隆到 BamHI 和 EcoRI 酶切并纯化后的 pcDNA3.1(+) (见图 6) 载体; 而 X2pMD18-T 克隆则用 EcoRI 和 KpnI 来进行酶切, 继而克隆到用 EcoRI 和 KpnI 来酶切并纯化后的 pcDNA3.1(-) (见图 6) 载体上。所得到的这些重组的 pcDNA3.1(+)/

10 (-) (S1、S2、E、M、N 和 X2) 克隆 (见图 7) 将作为 DNA 疫苗可能的候选, 进行动物的试验来检验。

表三、6 个片段克隆的设计

目标克隆	插入基因来源	连接克隆用的 pcDNA3.1 载体
pcDNA3.1(+)-S1	BamHI/EcoRI 酶切的 S1 片段 (~1980 bp), 来源于 pMD18-T/S1	BamHI/EcoRI 酶切的 pcDNA3.1(+)
pcDNA3.1(+)-S2	BamHI/EcoRI 酶切的 S2 片段 (~1940 bp), 来源于 pMD18-T/S2	BamHI/EcoRI 酶切的 pcDNA3.1(+)
pcDNA3.1(+)-E	BamHI/EcoRI 酶切的 E 片段 (~300 bp), 来源于 pMD18-T/E	BamHI/EcoRI 酶切的 pcDNA3.1(+)
pcDNA3.1(+)-M	BamHI/EcoRI 酶切的 M 片段 (~760 bp) pMD18-T/M	BamHI/EcoRI 酶切的 pcDNA3.1(+)
pcDNA3.1(+)-N	BamHI/EcoRI 酶切的 N 片段 (~1315 bp) pMD18-T/N	BamHI/EcoRI 酶切的 pcDNA3.1(+)
pcDNA3.1(-)-X2	KpnI/EcoRI 酶切的 X2 片段 (~380 bp) pMD18-T/X2	KpnI/EcoRI 酶切的 pcDNA3.1(-)

序列表

<110> 深圳市清华源兴生物医药科技有限公司

<120> 抗SARS疫苗

<130> CGCNS30935

<140> CN

<141> 2003-06-17

<160> 3

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 29745

<212> RNA

<213> SARS 冠状病毒(SARS-CoV)

```

<400> 1
ctaccagga.aaagccaacc aacctcgatc tctttagat ctgttctcta aacgaacttt 60
aaaatctgtg tagctgtcgc tcggctgcat gcctagtga cctacgcagt ataaacaata 120
ataaatttta ctgtcgttga caagaaacga gtaactcgtc cctcttctgc agactgctta 180
cggtttcgtc cgtgttgacg tcgatcatca gcatacctag gtttcgtccg ggtgtgaccg 240
aaaggttaaga tggagagcct tgttcttggg gtcaacgaga aaacacacgt ccaactcagt 300
ttgcctgtcc ttcaggttag agacgtgcta gtgcgtggct tcggggactc tgtggaagag 360
gccctatcgg aggcacgtga acacctcaaa aatggcactt gtggtctagt agagctggaa 420
aaaggcgtag tgcctcagct tgaacagccc tatgtgttca ttaaactgtc tgatgcctta 480
agcaccaatc actgccacaa ggctgttgag ctggttgacg aaatggacgg cattcagtag 540
ggctgtagcg gtataacact gggagtactc gtgccacatg tgggcgaaac cccaattgca 600
taccgcaatg ttcttcttcg taagaacggg aataaggag cgggtgttca tagctatggc 660
atcgatctaa agtcttatga cttaggtgac gagcttgga ctgatcccat tgaagattat 720
gaacaaaact ggaacactaa gcattggcgt ggtgcactcc gtgaactcac tcgtgagctc 780
aatggaggtg cagtcactcg ctatgtcgac aacaatttct gtggcccaga tgggtaccct 840
cttgattgca tcaaagattt tctcgacgc gcgggcaagt caatgtgac tctttccgaa 900
caacttgatt acatcgagtc gaagagaggt gtctactgct gccgtgacca tgagcatgaa 960
attgcctggt tcatgagcg ctctgataag agctacgagc accagacacc cttcgaaatt 1020
aagagtgcc aaaaatttga cactttcaaa ggggaatgcc caaagtttgt gtttcctctt 1080

```

gctgctaaca tacacctgaa acatgggtggt ggtgtagcag gtgcactcaa caaggcaacc 3420
 aatgggtgcca tgcaaaagga gagtgatgat tacattaagc taaatggccc tcttacagta 3480
 ggagggtctt gtttgctttc tggacataat cttgctaaga agtgtctgca tgttgttgga 3540
 cctaacctaa atgcaggta ggacatccag cttcttaagg cagcatatga aaatttcaat 3600
 tcacaggaca cttacttgcc accattgttg tcagcaggca tatttggcgc taaaccactt 3660
 cagtctttac aagtgtgogt gcagacggtt cgtacacagg tttatattgc agtcaatgac 3720
 aaagctcttt atgagcagggt tgcctatgat tatcttgata acctgaagcc tagagtggaa 3780
 gcacctaaac aagaggagcc accaaacaca gaagattcca aaactgagga gaaatctgtc 3840
 gtacagaagc ctgtcgatgt gaagccaaaa attaaggcct gcattgatga ggttaccaca 3900
 aacttggaag aaactaagtt tcttaccat aagttactct tgtttgtga tatcaatggt 3960
 aagctttacc atgattctca gaacatgctt agaggtgaag atatgtcttt ccttgagaag 4020
 gatgcacctt acatggtagg tgatgttatc actagtgggt atatcacttg tgttgtaata 4080
 ccttccaaaa aggtctggtg cactactgag atgctctcaa gagctttgaa gaaagtgcc 4140
 gttgatgagt atataaccac gtaccctgga caaggatgtg ctggttatac acttgaggaa 4200
 gctaggactg ctcttaagaa atgcaaatct gcattttatg tactaccttc agaagcacct 4260
 aatgctaagg aagagattct aggaactgta tcctggaatt tgagagaaat gcttgctcat 4320
 gctgaagaga caagaaaatt aatgcctata tgcattgatg ttagagccat aatggcaacc 4380
 atccaacgta agtataaagg aattaaaatt caagagggca tcgttgacta tgggtgccga 4440
 ttcttctttt atactagtaa agagcctgta gcttctatta ttacgaagct gaactctcta 4500
 aatgagccgc ttgtcacaat gccaatgggt tatgtgacac atgggtttta tcttgaagag 4560
 gctgcgcgct gtatgcgttc tcttaagct cctgccgtag tgtcagtatc atcaccagat 4620
 gctgttacta catataatgg atacctcact tcgtcatcaa agacatctga ggagcacttt 4680
 gtagaaacag tttctttggc tggctcttac agagattggt cctattcagg acagcgtaca 4740
 gagttagggt ttgaatttct taagcgtggt gacaaaattg tgtaccacac tctggagagc 4800
 cccgtcgagt ttcatcttga cggtagaggt ctttcacttg acaactaaa gagtctctta 4860
 tccttgcggg aggttaagac tataaaagtg ttcacaactg tggacaacac taatctccac 4920
 acacagcttg tggatatgtc tatgacatat ggacagcagt ttggtccaac atacttgat 4980
 ggtgctgatg ttacaaaaat taaacctcat gtaaatcatg agggttaagac tttctttgta 5040
 ctacctagtg atgacacact acgtagtga gctttcgagt actaccatac tcttgatgag 5100
 agttttcttg gtaggtacat gtctgcttta aaccacacaa agaaatggaa atttcctcaa 5160
 gttgggtggt taacttcaat taaatgggt gataacaatt gttattgtc tagtgttta 5220
 ttagcacttc aacagattga agtcaaattc aatgcaccag cacttcaaga ggcttattat 5280
 agagcccgtg ctggtgatgc tgctaacttt tgtgcactca tactcgctta cagtaataaa 5340
 actgttggcg agcttgggtg tgtcagagaa actatgaccc atcttctaca gcatgcta 5400
 ttggaatctg caaagcgagt tcttaatgtg gtgtgtaaac attgtgtgca gaaaactact 5460
 accttaacgg gtgtagaagc tgtgatgtat atgggtactc tatcttatga taatcttaag 5520
 acaggtgttt ccattccatg tgtgtgtggt cgtgatgcta cacaatatct agtacaacaa 5580
 gagtcttctt ttgttatgat gtctgcacca cctgctgagt ataaattaca gcaaggtaca 5640

aactcaaaag tcaaagtcac tcaaccacgt gttgaaaaga aaaagactga gggtttcatg 1140
gggcgtatac gctctgtgta cctctgtgca tctccacagg agtgtaacaa catgcacttg 1200
tctaccttga tgaaatgtaa tcattgcgat gaagtttcat ggcagacgtg cgactttctg 1260
aaagccactt gtgaacattg tggcactgaa aatttagtta ttgaaggacc tactacatgt 1320
gggtacctac ctactaatgc ttagtgaaa atgccatgtc ctgcctgtca agaccagag 1380
attggacctg agcatagtgt tgcagattat cacaaccact caaacattga aactcgactc 1440
cgcaagggag gtaggactag atgttttga ggctgtgtgt ttgcctatgt tggctgctat 1500
aataagcgtg cctactgggt tcctcgtgct agtgctgata ttggctcagg ccatactggc 1560
attactggtg acaatgtgga gaccttgaat gaggatctcc ttgagatact gagtctgaa 1620
cgtgttaaca ttaacattgt tggcgatttt catittgaatg aagaggttgc catcattttg 1680
gcatctttct ctgcttctac aagtgccttt attgacacta taaagagtct tgattacaag 1740
tctttcaaaa ccattgttga gtctcgcggt aactataaag ttaccaaggg aaagcccgtg 1800
aaaggtgctt ggaacattgg acaacagaga tcagttttaa caccactgtg tggttttccc 1860
tcacaggctg ctggtgttat cagatcaatt ttgcgcgca cacttgatgc agcaaaccac 1920
tcaattcctg atttgcaag agcagctgtc accatacttg atggtatttc tgaacagtca 1980
ttacgtcttg tcgacgcat ggtttatact tcagacctgc tcaccaacag tgcattatt 2040
atggcatatg taactggtgg tcttgtaaa cagacttctc agtggtgtc taatctttg 2100
ggcactactg ttgaaaaact caggcctatc ttgaaatgga ttgaggcgaa acttagtgca 2160
ggagttgaat ttctcaagga tgcttgggag attctcaaat ttctcattac aggtgttttt 2220
gacatcgtca aggttcaaat acaggttgct tcagataaca tcaaggattg tgtaaaatgc 2280
ttcattgatg ttgttaacaa ggcactcgaa atgtgcattg atcaagtcac tatcgtggc 2340
gcaaagtgtc gatcactcaa cttaggtgaa gtcttcacg ctcaaagcaa gggactttac 2400
cgtcagtgtg tacgtggcaa ggagcagctg caactactca tgctctttaa ggcacaaaa 2460
gaagtaacct ttctgaagg tgattcacat gacacagtac ttacctctga ggaggttgtt 2520
ctcaagaacg gtgaactcga agcactcgag acgcccgttg atagcttcac aaatggagct 2580
atcgttggca caccagtctg tgtaaatggc ctcagtctct tagagattaa ggacaaagaa 2640
caatactgag cattgtctcc tggtttactg gctacaaaca atgtctttcg cttaaaggg 2700
gggtgcacaa ttaaagggtg aacctttgga gaagatactg ttgggaagt tcaaggttac 2760
aagaatgtga gaatcacatt tgagcttgat gaacgtgttg acaaagtgtc taatgaaaag 2820
tgctctgtct acactgttga atccggtacc gaagtactg agtttgcatg tgtttagca 2880
gaggctgttg tgaagacttt acaaccagtt tctgatctcc ttaccaacat gggatttgat 2940
cttgatgagt ggagtgtac tacattctac ttatttgatg atgctggtga agaaaacttt 3000
tcacacgta tgtattgttc cttttaccct ccagatgagg aagaagagga cgatgcagag 3060
tgtgaggaag aagaattga tgaaacctgt gaacatgagt acggtacaga ggatgattat 3120
caaggtctcc ctctggaatt tggcgctca gctgaaacag ttcgagttga ggaagaagaa 3180
gaggaagact ggttgatga tactactgag caatcagaga ttgagccaga accagaacct 3240
acacctgaag aaccagttaa tcagtttact ggttatttaa aacttactga caatgttgcc 3300
attaaatgtg ctgacatcgt taaggaggca caaagtgtc atcctatggt gattgtaaat 3360

ttcttatgtg cgaatgagta cactggtaac tatcagtgtg gtcattacac tcatataact 5700
 gctaaggaga cccctctatcg tattgacgga gctcacctta caaagatgtc agagtacaaa 5760
 ggaccagtga ctgatgtttt ctacaaggaa acatcttaca ctacaacat caagcctgtg 5820
 tcgtataaac tcgatggagt tacttacaca gagattgaac caaaattgga tgggtattat 5880
 aaaaaggata atgcttacta tacagagcag cctatagacc ttgtaccaac tcaaccatta 5940
 ccaaatgcga gttttgataa tttcaaacct acatgttcta acacaaaatt tgctgatgat 6000
 ttaaatcaaa tgacaggctt cacaagcca gcttcacgag agctatctgt cacattcttc 6060
 ccagacttga atggcgatgt agtggctatt gactatagac actattcagc gagtttcaag 6120
 aaaggtgcta aattactgca taagccaatt gtttggcaca ttaaccaggc tacaaccaag 6180
 acaacgttca aaccaaacac ttggtgttta cgttgtcttt ggagtacaaa gccagtagat 6240
 acttcaaatt catttgaagt tctggcagta gaagacacac aaggaatgga caatcttgct 6300
 tgtgaagtc aacaaccac ctctgaagaa gtagtggaaa atcctaccat acagaaggaa 6360
 gtcatagagt gtgacgtgaa aactaccgaa gttgtaggca atgtcatact taaaccatca 6420
 gatgaagggtg ttaaagtaac acaagagtta ggtcatgagg atcttatggc tgcttatgtg 6480
 gaaaacacaa gcattaccat taagaaacct aatgagcttt cactagcctt aggtttaaaa 6540
 acaattgcc a tcatggtat tgctgcaatt aatagtgttc cttggagtaa aatttttgct 6600
 tatgtcaaac cattcttagg acaagcagca attacaacat caaattgcgc taagagatta 6660
 gcacaacgtg tgtttaacaa ttatagcct tatgtgttta cattattgtt ccaattgtgt 6720
 acttttacta aaagtaccaa ttctagaatt agagcttcac tacctacaac tattgctaaa 6780
 aatagtgtta agagtgttgc taaattatgt ttggatgccg gcattaatta tgtgaagtca 6840
 cccaaatttt ctaaattgtt cacaatcgct atgtggctat tgttgtaag tatttgctta 6900
 ggttctctaa tctatgtaac tgctgctttt ggtgtactct tatctaattt tgggtgctct 6960
 tcttattgta atggcgtagg agaattgtat cttaattcgt ctaacgttac tactatggat 7020
 ttctgtgaag gttcttttcc ttgcagcatt tgtttaagt gattagactc ccttgattct 7080
 tatccagctc ttgaacatc tcaggtgacg atttcatcgt acaagctaga ctgacaatt 7140
 ttaggtctgg ccgctgagtg ggttttgcca tatatgttgt tcacaaaatt cttttattta 7200
 ttaggtcttt cagctataat gcaggtgttc tttggtatt ttgctagtca ttcatcagc 7260
 aattcttggc tcatgtggtt tatcattagt attgtacaaa tggcacccgt ttctgcaatg 7320
 gttagatgt acatcttctt tgcttcttct tactacatat ggaagagcta tttcatatc 7380
 atggatggtt gcacctcttc gacttgcatt atgtgtata agcgcaatcg tgccacacgc 7440
 gttgagtgt caactattgt taatggcatt aagagatctt tctatgtcta tgcaaatgga 7500
 ggccgtggct tctgcaagac tcacaattgg aattgtctca attgtgacac atttgcact 7560
 ggtagtacat tcattagtga tgaagtgtc cgtgatttgt cactccagtt taaaagacca 7620
 atcaacccta ctgaccagtc atcgtatatt gttgatagt ttgctgtgaa aaatggcgcg 7680
 cttcacctct actttgacaa ggttggtcaa aagacctatg agagacatcc gctctcccat 7740
 tttgtcaatt tagacaattt gagagctaac aacactaaag gttcactgcc tattaatgtc 7800
 atagtttttg atggcaagtc caaatgcgac gagtctgctt ctaagtctgc ttctgtgtac 7860
 tacagtcagc tgatgtgcca acctattctg ttgcttgacc aagctcttgt atcagacgtt 7920

ggagatagta ctgaagtttc cgtaagatg ttgatgctt atgtcgacac cttttcagca 7980
 acttttagtg ttcctatgga aaaacttaag gcacttggtg ctacagctca cagcgagtta 8040
 gcaaaggtg tagctttaga tgggtgcctt tctacattcg tgtcagctgc ccgacaaggt 8100
 gttgttgata ccgatgttga cacaagggat gttattgaat gtctcaaaact ttcacatcac 8160
 tctgacttag aagtacaggg tgacagttgt aacaatttca tgctcaccta taataagggt 8220
 gaaaacatga cccccagaga tcttggcgca tgtattgact gtaatgcaag gcatatcaat 8280
 gcccaagtag caaaaagtc caatgtttca ctcatctgga atgtaaaaga ctacatgtct 8340
 ttatctgaac agctgcgtaa acaaattcgt agtgctgcc aagaagaaca catacctttt 8400
 agactaactt gtgctacaac tagacaggtt gtcaatgtca taactactaa aatctcactc 8460
 aagggtggta agattgttag tacttggtt aaacttatgc ttaaggccac attattgtgc 8520
 gttcttgctg cattggtttg ttacatcggt atgccagtac atacattgtc aatccatgat 8580
 ggttacacaa atgaatcat tggttacaaa gccattcagg atggtgtcac tctgacatc 8640
 atttctactg atgattgttt tgcaataaa catgctggtt ttgacgcatg gtttagccag 8700
 cgtgggtggt catacaaaaa tgacaaaagc tgccctgtag tagctgctat cattacaaga 8760
 gagattggtt tcatagtgc tggcttaccg ggtactgtgt tgagagcaat caatggtgac 8820
 ttcttgcat ttctacctg tgttttagt gctgttgga acatttgcta cacaccttcc 8880
 aaactcattg agtatagtga ttttctacc tctgcttgcg ttcttgctgc agagtgtaca 8940
 atttttaagg atgctatggg caaacctgtg ccatattgtt atgacactaa ttgctagag 9000
 ggttctatct cttatagtga gcttcgtcca gacactcgtt atgtgcttat ggatggttcc 9060
 atcatacagt ttcctaacat ttacctggag ggttctgta gagtagtaac aacttttgat 9120
 gctgagtact gtagacatgg tacatgcgaa aggtcagaag caggtatttg cctatctacc 9180
 agtggtagat gggttcttaa taatgagcat tacagagctc taccaggagt tttctgtggt 9240
 gttgatgcga tgaatctcat agctaacatc ttactctc tttgtcaacc tgtgggtgct 9300
 ttagatgtgt ctgcttcagt agtggtggt ggtattattg ccatattggt gacttgctgt 9360
 gcctactact ttatgaaatt cagacgtgct ttggtgagt acaaccatgt tgttgctgct 9420
 aatgcacttt tgttttgat gtctttcact atactctgtc tggcaccagc ttacagcttt 9480
 ctgccgggag tctactcagt cttttacttg tacttgacat tctatttcac caatgatgtt 9540
 tcattcttgg ctacacttca atggtttgcc atgttttctc ctattgtgcc tttttgata 9600
 acagcaatct atgtattctg tatttctctg aagcactgcc attggttctt taacaactat 9660
 cttaggaaaa gagtcatgtt taatggagtt acatttagta ccttcgagga ggctgctttg 9720
 tgtacctttt tgcacaacaa ggaaatgtac ctaaaattgc gtagcgagac actgttgcca 9780
 cttacacagt ataacaggta tcttgcctta tataacaagt acaagtattt cagtggagcc 9840
 ttagatacta ccagctatcg tgaagcagct tgctgccact tagcaaaggc tctaaatgac 9900
 tttagcaact caggtgctga tgttctctac caaccaccac agacatcaat cacttctgct 9960
 gttctgcaga gtggttttag gaaaatggca ttcccgtcag gcaaagtga aggatgcatg 10020
 gtacaagtaa cctgtggaac tacaactctt aatggattgt ggttgatga cacagtatac 10080
 tgtccaagac atgtcatttg cacagcagaa gacatgctta atcctaacta tgaagatctg 10140
 ctcatcgcga aatccaacca tagctttctt gttcaggtg gcaatgttca acttctgtt 10200

attggccatt ctatgcaaaa ttgtctgctt aggcctaaag ttgatacttc taaccetaag 10260
 acaccaagt ataaatttgt cegtatccaa cctggtcaaa cattttcagt tctagcatgc 10320
 tacaatggtt caccatctgg tgtttatcag tgtgcatga gacctaatca taccattaaa 10380
 ggttctttcc ttaatggatc atgtggtagt gttggtttta acattgatta tgattgctg 10440
 tctttctgct atatgcatca tatggagctt ccaacaggag tacacgctgg tactgactta 10500
 gaaggtaaat tctatggtcc atttgttgac agacaaactg cacaggctgc aggtacagac 10560
 acaaccataa cattaaatgt tttggcatgg ctgtatgctg ctgttatcaa tggatgtagg 10620
 tggtttctta atagattcac cactactttg aatgacttta acctgtggc aatgaagtac 10680
 aactatgaac ctttgacaca agatcatggt gacatattgg gacctcttc tgctcaaaaca 10740
 ggaattgccg tcttagatat gtgtgctgct ttgaaagagc tgctgcagaa tggatgaat 10800
 ggtcgtacta tccttgtag cactatttta gaagatgagt ttacaccatt tgatgttgtt 10860
 agacaatgct ctgggtgtac ctccaaggt aagtcaaga aaattgttaa gggcactcat 10920
 cattggatgc ttttaacttt ctgacatca ctattgattc ttgtcaaag tacacagtgg 10980
 tcaactgttt tctttgttta cgagaatgct ttcttgccat ttactcttg tattatggca 11040
 attgctgcat gtgctatgct gcttgtaag cataagcacg cattcttggtg cttgtttctg 11100
 ttacctctc ttgcaacagt tgcttacttt aatatggtct acatgcctgc tagctgggtg 11160
 atgcgtatca tgacatggct tgaattggct gacactagct tgtctggta taggcttaag 11220
 gattgtgta tgtatgcttc agctttagtt ttgcttattc tcatgacagc tcgactgtt 11280
 tatgatgatg ctgctagacg tgtttggaca ctgatgaatg tcattacact tgtttacaaa 11340
 gtctactatg gtaatgcttt agatcaagct atttccatgt gggccttagt tatttctgta 11400
 acctctaact attctggtgt cgttacgact atcatgttt tagctagagc tatagtgtt 11460
 gtgtgtgtg agtattacc attgttattt attactggca acaccttaca gtgtatcatg 11520
 cttgtttatt gtttcttag ctattgttgc tgcgtctact ttggccttt ctgtttactc 11580
 aaccgttact tcaggcttac tcttggtgtt tatgactact tggctctac acaagaattt 11640
 aggtatatga actcccagg gcttttgct cctaagagta gtattgatgc tttcaagctt 11700
 aacattaagt tgttgggtat tggaggtaaa ccatgtatca aggttgctac tgtacagtct 11760
 aaaatgtctg acgtaaagt caccatctgt gtactgtct cggttcttca acaacttaga 11820
 gtagagtcat ctctaaatt ttgggcacaa tgtgtacaac tccacaatga tattcttctt 11880
 gcaaaagaca caactgaagc ttctgagaag atggtttctc tttgtctgt tttgctatcc 11940
 atgcagggtg ctgtagacat taataggtt tgcgaggaaa tgctcgataa ccgtgctact 12000
 cttcaggcta ttgcttcaga atttagttct ttaccatcat atgccgtta tgccactgcc 12060
 caggaggcct atgagcaggc ttagctaat ggtgattctg aagtcgttct caaaaagta 12120
 aagaaatctt tgaatgtggc taaatctgag ttgaccgtg atgctgccat gcaacgcaag 12180
 ttggaaaaga tggcagatca ggctatgacc caaatgtaca aacaggcaag atctgaggac 12240
 aagagggcaa aagtaactag tgctatgcaa acaatgtct tcaactatgct taggaagctt 12300
 gataatgatg cacttaacaa cattatcaac aatgcgctg atggttgtgt tccactcaac 12360
 atcataccat tgactacagc agccaaactc atggttgttg tccctgatta tggtaacctac 12420
 aagaacactt gtgatggtta cacctttaca tatgcatctg cactctggga aatccagcaa 12480

gttgttgatg cggatagcaa gattgttcaa cttagtgaat ttaacatgga caattcacca 12540
 aatttggctt ggccctcttat tgttacagct ctaagagcca actcagctgt taaactacag 12600
 aataatgaac tgagtccagt agcactacga cagatgtcct gtgcggctgg taccacacaa 12660
 acagcttgta ctgatgacaa tgcacttgcc tactataaca attcgaaggg aggtaggttt 12720
 gtgctggcat tactatcaga ccaccaagat ctcaaatggg ctagattccc taagagtgt 12780
 ggtacaggta caatttacac agaactggaa ccaccttgta ggtttggtac agacacacca 12840
 aaagggccta aagtgaataa cttgtacttc atcaaaggct taaacaacct aaatagaggt 12900
 atggtgctgg gcagtttagc tgctacagta cgtcttcagg ctggaaatgc tacagaagta 12960
 cctgccatt caactgtgct ttccttctgt gcttttgag tagaccctgc taaagcatat 13020
 aaggattacc tagcaagtgg aggacaacca atcaccaact gtgtgaagat gttgtgtaca 13080
 cacactgga caggacaggc aattactgta acaccagaag ctaacatgga ccaagagtcc 13140
 tttggtggg cttcatgttg tctgtattgt agatgccaca ttgaccatcc aaatcctaaa 13200
 ggattctgtg acttgaaagg taagtacgct caaataccta ccacttggtc taatgacca 13260
 gtgggtttta cacttagaaa cacagtctgt accgtctgct gaatgtgga aggttatggc 13320
 ttagttgtg accaactccg cgaacccttg atgcagctg cggatgcac aacgttttta 13380
 aacgggttg cgggtgaagt gcagcccgct ttacaccgtg cggcacaggc actagtactg 13440
 atgtcgtcta cagggctttt gatatttaca acgaaaaagt tgctggtttt gcaaagtcc 13500
 taaaaactaa ttgctgtcgc ttccaggaga aggatgagga aggcaattta ttagactctt 13560
 actttgtagt taagaggcat actatgtcta actaccaaca tgaagagact atttataact 13620
 tggtaaaga ttgtccagc gttgctgtcc atgacttttt caagtttaga gtagatggg 13680
 acatggtacc acatatatca cgtcagcgtc taactaaata cacaatggct gatttagtct 13740
 atgtctacg tcattttgat gagggttaatt gtgatacatt aaaagaaata ctggtcacat 13800
 acaattgctg tgatgatgat tatttcaata agaaggatg gtatgacttc gtagagaatc 13860
 ctgacatctt acgcgtatat gctaacttag gtgagcgtgt acgccaatca ttattaaaga 13920
 ctgtacaatt ctgcgatgct atgcgtgatg caggcattgt aggcgtagt acattagata 13980
 atcaggatct taatgggaac tggtagcatt tcggtgattt cgtacaagta gcaccaggct 14040
 gcggagtcc tattgtggat tcatattact cattgtgat gccatcctc actttgacta 14100
 gggcattggc tgctgagtc catatggatg ctgatctcgc aaaaccactt attaatggg 14160
 atttgctgaa atatgatttt acggaagaga gactttgtct ctgcaccgt tattttaaat 14220
 attgggacca gacataccat ccaattgta ttaactgttt ggatgatagg tgtatccttc 14280
 attgtgaaa ctttaattgt ttattttcta ctgtgtttcc acctacaagt ttggaccac 14340
 tagtaagaaa aatattttgta gatggtgttc cttttgtgt ttcaactgga taccattttc 14400
 gtgagttagg agtcgtacat aatcaggatg taaacttaca tagctcgcgt ctcagtttca 14460
 aggaactttt agtgtatgct gctgaccag ctatgcatgc agcttctggc aatttattgc 14520
 tagataaacg cactacatgc ttttcagtag ctgcactaac aaacaatgtt gcttttcaaa 14580
 ctgtcaaacc cggtaatttt aataaagact ttatgactt tgctgtgtct aaaggtttct 14640
 ttaaggaagg aagtctgtt gaactaaaac acttcttctt tgctcaggat ggcaacgctg 14700
 ctatcagtga ttatgactat tatcgttata atctgccaac aatgtgtgat atcagacaac 14760

tcctattcgt agttgaagtt gttgataaat actttgattg ttacgatggt ggctgtatta 14820
 atgccaacca agtaatcgtt aacaatctgg ataatcagc tggtttccca tttaataaat 14880
 ggggtaaggc tagactttat tatgactcaa tgagttatga ggatcaagat gcacttttcg 14940
 cgtatactaa gcgtaatgtc atccctacta taactcaaat gaatcttaag tatgccatta 15000
 gtgcaaagaa tagagctcgc accgtagctg gtgtctctat ctgtagtact atgacaaata 15060
 gacagtttca tcagaaatta ttgaagtcaa tagccgccac tagaggagct actgtggtaa 15120
 ttggaacaag caagttttac ggtggctggc ataatatgtt aaaaactgtt tacagtgatg 15180
 tagaaactcc acaccttatg ggttgggatt atccaaaatg tgacagagcc atgcctaaca 15240
 tgcttaggat aatggcctct cttgttcttg ctgcaaaca taacacttgc tgtaacttat 15300
 cacaccgttt ctacaggta gctaacgagt gtgcgcaagt attaagttag atggtcatgt 15360
 gtggcggtc actatatgtt aaaccagggt gaacatcatc cggtagtgct acaactgtt 15420
 atgctaatag tgtctttaac atttgtcaag ctgttacagc caatgtaat gcacttctt 15480
 caactgatgg taataagata gctgacaagt atgtccgcaa tctacaacac aggctctatg 15540
 agtgtctcta tagaaatagg gatgttgatc atgaattcgt ggatgagttt tacgcttacc 15600
 tgcgtaaaca ttttccatg atgattcttt ctgatgatgc cgttgtgtgc tataacagta 15660
 actatgcggc tcaaggttta gtagctagca ttaagaactt taaggcagtt ctttattatc 15720
 aaaataatgt gttcatgtct gaggcaaat gttggactga gactgacctt actaaaggac 15780
 ctcacgaatt ttgctcacag catacaatgc tagttaaaca aggagatgat tacgtgtacc 15840
 tgccttacc agatccatca agaataatag gcgcaggctg tttgtcgat gatattgtca 15900
 aaacagatgg tacacttatg attgaaaggt tcgtgtcact ggctattgat gcttaccac 15960
 ttacaaaaca tcctaatacag gagtatgctg atgtctttca cttgtattta caatacatta 16020
 gaaagtta tgaatgagctt actggccaca gtttgacat gtattccgta atgctaacta 16080
 atgataacac ctcacggtag tgggaacctg agttttatga ggctatgtac acaccacata 16140
 cagtcttgca ggctgtaggt gcttgtgtat tgtgcaattc acagacttca cttcgttgcg 16200
 gtgcctgtat taggagacca ttcctatgtt gcaagtgtg ctatgacat gtcatttcaa 16260
 catcacacaa attagtgttg tctgttaatc cctatgtttg caatgcccc ggttgtgatg 16320
 tcaactgatg gacacaactg tatctaggag gtatgagcta ttattgcaag tcacataagc 16380
 ctcccattag ttttcatta tgtgctaagt gtcagggttt tggtttatac aaaacacat 16440
 gtgtaggcag tgacaatgtc actgacttca atgcgatagc aacatgtgat tggactaatg 16500
 ctggcgatta catacttgcc aacacttgta ctgagagact caagcttttc gcagcagaaa 16560
 cgctcaaagc cactgaggaa acatttaagc tgtcatatgg tattgccact gtacgcgaag 16620
 tactctctga cagagaattg catctttcat gggaggttgg aaaacctaga ccaccattga 16680
 acagaaacta tgtctttact ggttaccgtg taactaaaa tagtaaagta cagattggag 16740
 agtacacctt tgaanaaggt gactatgggt atgctgttgt gtacagaggt actacgacat 16800
 acaagttgaa tgttgggtat tactttgtgt tgacatctca cactgtaatg ccacttagtg 16860
 cacctactct agtgcacaa gagcactatg tgagaattac tggctgtac ccaacactca 16920
 acatctcaga tgagttttct agcaatgttg caaattatca aaagtcggc atgcaaaagt 16980
 actctacact ccaaggacca cctgttactg gtaagagtca ttttccatc ggacttgctc 17040

tctattaccc atctgctcgc atagtgtata cggcatgctc tcatgcagct gttgatgccc 17100
tatgtgaaaa ggcatacaaaa tatttgccca tagataaatg tagtagaatc atacctgccc 17160
gtgcgcgcgt agagtgtttt gataaattca aagtgaattc aacactagaa cagtatgttt 17220
tctgcactgt aaatgcattg ccagaaacaa ctgctgacat ttagtctttt gatgaaatct 17280
ctatggctac taattatgac ttgagtgttg tcaatgctag acttcgtgca aaacactacg 17340
tctatattgg cgatcctgct caattaccag cccccgcac attgctgact aaaggcacac 17400
tagaaccaga atattttaat tcagtgtgca gacttatgaa aacaataggt ccagacatgt 17460
tccttggaaac ttgtgcgcgt tgtcctgctg aaattgttga cactgtgagt gcttttagttt 17520
atgacaataa gctaaaagca cacaaggaga agtcagctca atgcttcaaa atgttctaca 17580
aagggtttat tacacatgat gtttcactg caatcaacag acctcaaaata ggcgttgtaa 17640
gagaatttct tacacgcaat cctgcttgga gaaaagctgt tttatctca ccttataatt 17700
cacagaacgc ttagcttca aaaatcctag gattgcctac gcagactgtt gattcatcac 17760
agggttctga atagactat gtcatttca cacaactac tgaacagca cactcttgta 17820
atgtcaaccg cttcaatgtg gctatcaca gggcaaaaat tggcattttg tgcataatgt 17880
ctgatagaga tctttatgac aaactgcaat ttacaagtct agaaatacca cgtcgcaatg 17940
tggctacatt acaagcagaa aatgtaactg gactttttaa ggactgtagt aagatcatta 18000
ctggcttca tctacacag gcacctacac acctcagcgt tgatataaag ttcaagactg 18060
aaggattatg tgttgacata ccaggcatac caaaggacat gacctaccgt agactcatct 18120
ctatgatggg ttcaaaatg aattaccaag tcaatggta ccctaataag tttatcacc 18180
gcgaagaagc tattcgtcac gttcgtcgt ggattggctt tgatgtagag ggctgtcatg 18240
caactagaga tgctgtgggt actaacctac ctctccagct aggattttct acagggttta 18300
acttagtagc tgtaccgact ggttatgttg acactgaaaa taacacagaa ttcaccagag 18360
ttaatgcaaa acctccacca ggtgaccagt ttaacatct tataccactc atgtataaag 18420
gcttgccctg gaatgtagt cgtattaaga tagtacaat gctcagtgat aactgaaag 18480
gattgtcaga cagatcgtg ttcgtcctt gggcgcatgg ctttgagctt acatcaatga 18540
agtactttgt caagattgga cctgaaagaa cgtgttgtct gtgtgacaaa cgtgcaactt 18600
gcttttctac ttcatcagat acttatgcct gctggaatca ttctgtgggt ttgactatg 18660
tctataaccc atttatgatt gatgttcagc agtggggctt tacgggtaac cttcagagta 18720
accatgacca acattgccag gtacatggaa atgcacatgt ggctagtgtg gatgctatca 18780
tgactagatg tttagcagtc catgagtgtt ttgttaagcg cgttgattgg tctgttgaat 18840
acctattat aggagatgaa ctgagggtta attctgcttg cagaaaagta caacacatgg 18900
ttgtgaagtc tgcattgctt gctgataagt ttccagttct tcatgacatt ggaaatccaa 18960
aggctatcaa gtgtgtgcct caggctgaag tagaatggaa gttctacgat gctcagccat 19020
gtagtgacaa agcttacaaa atagaggaa tcttctattc ttatgctaca catcacgata 19080
aattcactga tgggtgttgt ttgttttga attgtaacgt tgatcggtac ccagccaatg 19140
caattgtgtg taggtttgac acaagagtct tgtcaaaact gaacttacca ggctgtgatg 19200
gtggtagttt gtatgtgaat aagcatgcat tccacactcc agctttcgat aaaagtgc 19260
ttactaattt aaagcaattg cctttctttt actattctga tagtcctgtg gagtctcatg 19320

gcaaacaagt agtgtcggat attgattatg ttccactcaa atctgctacg tgtattacac 19380
gatgcaattt aggtgggtgct gtttcagac accatgcaaa tgagtaccga cagtacttgg 19440
atgcatataa tatgatgatt tctgctggat ttagcctatg gatttacaaa caatttgata 19500
cttataacct gtggaatata tttaccaggt tacagagttt agaaaatgtg gcttataatg 19560
ttgttaataa aggacacttt gatggacacg cggcggaagc acctgtttcc atcattaata 19620
atgctgttta cacaaaggta gatggattg atgtggagat ctttgaaaat aagacaacac 19680
ttcctgttaa tgttgcaatt gagctttggg ctaagcgtaa cattaacca gtgccagaga 19740
ttaagatact caataatttg ggtgttgata tcgctgctaa tactgtaatc tgggactaca 19800
aaagagaagc cccagcacat gtatctacaa taggtgtctg cacaatgact gacattgcca 19860
agaaacctac tgagagtgtc tgttcttcac ttactgtctt gtttgatggt agagtgaag 19920
gacaggtaga cctttttaga aacgcccgtat atgggtgttt aataacagaa ggttcagtca 19980
aaggtctaac accttcaaag ggaccagcac aagctagcgt caatggagtc acattaattg 20040
gagaatcagt aaaaacacag tttaactact ttaagaaagt agacggcatt attcaacagt 20100
tgcttgaaac ctactttact cagagcagag acttagagga ttttaagccc agatcacaaa 20160
tggaactga ctttctcgag ctgctatgg atgaattcat acagcgatat aagctcgagg 20220
gctatgcctt cgaacacatc gtttatggag atttcagtca tggacaactt ggcggtcttc 20280
atttaatgat aggcttagcc aagcgctcac aagattcacc acttaatta gaggatttta 20340
tcctatgga cagcacagt gaaaattact tcataacaga tgcgcaaca ggttcacaa 20400
aatgtgtgtg ttctgtgatt gatcttttac ttgatgactt tgcgagata ataaagtcac 20460
aagatttgc agtgatttca aaagtgtca aggttacaat tgactatgct gaaatttcat 20520
tcatgctttg gtgtaaggat ggacatgtg aaaccttcta cccaaaacta caagcaagtc 20580
aagcgtggca accaggtgtt gcgatgccta acttgtacaa gatgcaaaga atgcttcttg 20640
aaaagtgtga ccttcagaat tatgggtgaa atgctgttat accaaaagga ataatgatga 20700
atgtcgcaaa gtatactcaa ctgtgtcaat acttaatac acttacttta gctgtaccct 20760
acaacatgag agttattcac tttgggtgtg gctctgataa aggagttgca ccaggtacag 20820
ctgtactcag acaatggttg ccaactggca cactacttgt cgattcagat cttaatgact 20880
tcgtctccga cgcagattct actttaatg gagactgtgc aacagtacat acggctaata 20940
aatgggacct tattattagc gatattgatg accctaagac caaacatgtg acaaaagaga 21000
atgactctaa agaagggttt ttactttatc tgtgtggatt tataaagcaa aaactagccc 21060
tgggtgtgtc tatagctgta aagataacag agcattcttg gaatgctgac ctttacaagc 21120
ttatgggcca tttctcatgg tggacagctt ttgttacaaa tgtaaatgca tcatcatcgg 21180
aagcattttt aattggggct aactatcttg gcaagccgaa ggaacaaatt gatggctata 21240
ccatgcatgc taactacatt ttctggagga acacaaatcc tatccagttg tcttctatt 21300
cactctttga catgagcaaa tttctctta aattaagagg aactgctgta atgtctctta 21360
aggagaatca aatcaatgat atgatttatt ctcttctgga aaaaggtagg cttatcatta 21420
gagaaaacaa cagagttgtg gtttcaagt atattcttgt taataactaa acgaacatgt 21480
ttattttctt attatttctt actctcacta gtggtagtga ccttgaccgg tgcaccactt 21540
ttgatgatgt tcaagctcct aattacactc aacatacttc atctatgagg ggggtttact 21600

atcctgatga aatttttaga tcagacactc tttatttaac tcaggattta tttcttccat 21660
 tttattctaa tgttacaggg tttcatacta ttaatcatac gtttgacaac cctgtcatac 21720
 cttttaagga tggatattat tttgtgccca cagagaaatc aaatgttgct cgtggttggg 21780
 tttttggttc taccatgaac aacaagtcac agtcggtgat tattattaac aattctacta 21840
 atgttggtat acgagcatgt aactttgaat tgtgtgacaa ccctttcttt gctgtttcta 21900
 aacctatggg tacacagaca catactatga tattcgataa tgcatttaac tgcactttcg 21960
 agtacatatac tcatgccttt tcgcttgatg tttcagaaaa gtcaggtaac tttaaacact 22020
 tacgagagtt tgtgtttaaa aataaagat ggtttctcta tgtttataag ggctatcaac 22080
 ctatagatgt agttcgtgat ctaccttctg gttttaacac ttgaaaccc atttttaagt 22140
 tgcctcttgg tattaacatt acaaatttta gagccattct tacagccttt ttacctgctc 22200
 aagacacttg gggcacgtca gctgcagcct atttgttgg ctatttaaag ccaactacat 22260
 ttatgctcaa gtatgatgaa aatgttcaaa tcacagatgc tgttgattgt tctcaaaatc 22320
 cacttgctga actcaaatgc tctgttaaga gctttgagat tgacaaagga atttaccaga 22380
 cctctaattt cagggttgtt cctcaagag atgttgtgag attccctaatt attacaaact 22440
 tgtgtccttt tggagaggtt ttaaatgcta ctaaattccc tctgtctat gcatgggaga 22500
 ggaaaagaat ttctaattgt gttgtgatt actctgtgct ctacaactca acattttttt 22560
 caacctttaa gtgctatggc gtttctgcca ctaagttgaa tgatctttgc ttctccaatg 22620
 tctatgcaga ttcttttcta gtcaaggag atgatgtaag acaaatagcg ccaggacaaa 22680
 ctggtgttat tgcgtattat aattataaat tgccagatga tttcatgggt tgtgtccttg 22740
 cttggaatac taggaacatt gatgctactt caactggtaa ttataattat aaatataggt 22800
 atcttagaca tggcaagctt aggccttttg agagagacat atctaattgt cctttctccc 22860
 ctgatggcaa accttgacc ccacctgctc ttaattgtta ttggccatta aatgattatg 22920
 gtttttacac cactactggc attggctacc aaccttacag agttgtagta ctttctttg 22980
 aacttttaaa tgcaccggcc acggtttgtg gacaaaaatt atccactgac cttattaaga 23040
 accagtgtgt caattttaat ttaaatggac tcactggtag tgggtgtgta actccttctt 23100
 caaagagatt tcaaccattt caacaatttg gccgtgatgt ttctgatttc actgattccg 23160
 ttcgagatcc taaaacatct gaaatattag acatttcacc ttgctctttt gggggtgtaa 23220
 gtgtaattac acctggaaca aatgcttcat ctgaagttgc tgttctatat caagatgta 23280
 actgcactga tgtttctaca gcaattcatg cagatcaact cacaccagct tggcgcatat 23340
 attctactgg aaacaatgta ttccagactc aagcaggctg tcttatagga gctgagcatg 23400
 tcgacacttc ttatgagtgc gacattccta ttggagctgg catttgtgct agttaccata 23460
 cagtttcttt attacgtagt actagccaaa aatctattgt ggcttatact atgtctttag 23520
 gtgctgatag ttcaattgct tactctaata acaccattgc tatactact aacttttcaa 23580
 ttagcattac tacagaagta atgcctgttt ctatggctaa aacctccgta gattgtaata 23640
 tgtacatctg cggagattct actgaatgtg ctaatttgc tctccaatat ggtagctttt 23700
 gcacacaact aaatcgtgca ctctcaggta ttgctgctga acaggatcgc aacacacgtg 23760
 aagtgttcgc tcaagtcaaa caaatgtaca aaaccccaac ttgaaagat tttggtggtt 23820
 ttaatttttc acaaatatta cctgacctc taaagccaac taagaggtct tttattgagg 23880

acttgctctt taataagggtg acactcgctg atgctggctt catgaagcaa tatggcgaat 23940
 gcctagggtga tattaatgct agagatctca tttgtgcga gaagttcaat ggacttacag 24000
 tgttgccacc tctgctcact gatgatatga ttgctgccta cactgctgct ctagttagt 24060
 gtactgccac tgctggatgg acatttggtg ctggcgctgc tcttcaaata ccttttgcta 24120
 tgcaaatggc atataaggtt aatggcattg gagttaccca aaatgttctc tatgagaacc 24180
 aaaacaaat cgccaaccaa tttacaagg cgattagtca aattcaagaa tcacttaca 24240
 caacatcaac tgcatgggc aagctgcaag acgttgtaa ccagaatgct caagcattaa 24300
 acacacttgt taaacaactt agctctaatt ttggtgcaat ttcaagtgtg ctaaagtata 24360
 tcctttcgcg acttgataaa gtcgaggcgg aggtacaaat tgacagggtta attacaggca 24420
 gacttcaaag ctttcaaacc tatgtaacac aacaactaat cagggtgct gaaatcagg 24480
 cttctgctaa tcttgctgct actaaaatgt ctgagtgtgt tcttgacaa tcaaaaagag 24540
 ttgacttttg cggaaagggc taccacctta tgccttccc acaagcagcc ccgcatggtg 24600
 ttgtcttctt acatgtcacg tatgtccat ccaggagag gaacttcacc acagcgccag 24660
 caatttgta tgaaggcaaa gcatacttcc ctctgaagg tgtttttgtg tttaatggca 24720
 cttcttggtt tattacacag aggaacttct tttctccaca aataattact acagacaata 24780
 catttgctc aggaatttgt gatgtcgta ttggcatcat taacaacaca gtttatgatc 24840
 ctctgcaacc tgagcttgac tcattcaaag aagagctgga caagtactc aaaaatcata 24900
 catcaccaga tgttgatctt ggcgacattt caggcattaa cgcttctgtc gtcaacattc 24960
 aagaagaaat tgaccgctc aatgaggtcg ctaaaaattt aaatgaatca ctcatgacc 25020
 ttcaagaatt gggaaaatat gagcaatata ttaaatggcc ttggtatgtt tggctcggt 25080
 tcattgctgg actaattgcc atcgatcatg ttacaatctt gctttgttgc atgactagtt 25140
 gttgcagttg cctcaagggt gcatgctctt gtggttcttg ctgcaagttt gatgaggatg 25200
 actctgagcc agttctcaag ggtgtcaaat tacattacac ataacgaac ttatggattt 25260
 gtttatgaga ttttttactc ttggatcaat tactgcacag ccagtaaaaa ttgacaatgc 25320
 ttctctgca agtactgttc atgctacagc aacgataccg ctacaagcct cactcccttt 25380
 cggatggctt gttattggcg ttgcatttct tgcgttttt cagagcgcta ccaaaataat 25440
 tgcgtcaat aaaagatggc agctagccct ttataagggc ttccagttca tttgcaattt 25500
 actgctgcta ttgtttacca tctattcaca tcttttgctt gtcgctgcag gtatggaggc 25560
 gcaatttttg tacctctatg cttgatata tttctacaa tgcataacg catgtagaat 25620
 tattatgaga tgttggtttt gtggaagtg caaatccaag aaccattac tttatgatgc 25680
 caactacttt gttgctggc acacacataa ctatgactac tgtataccat ataacagtgt 25740
 cacagatata attgtcgta ctgcaggta cggcatttca acacaaaac tcaagaaga 25800
 ctaccaaatt ggtggttatt ctgaggatg gcactcaggt gttaaagact atgtcgttgt 25860
 acatggctat ttcaccgaag ttactacca gcttgagtct acacaaatta ctacagacac 25920
 tggattgaa aatgctacat tcttcatctt taacaagctt gttaaagacc caccgaatgt 25980
 gcaaatcac acaatcgag gctcttcagg agttgcaat ccagcaatgg atccaattta 26040
 tgatgagccg acgacgacta ctagcgtgcc ttgttaagca caagaaagt agtacgaact 26100
 tatgtactca ttcgtttcgg aagaacagg tacgttaata gttaatagcg tacttcttt 26160

tcttgctttc gtggtattct tgctagtcac actagccatc cttactgccc ttcgattgtg 26220
tgcgtagtgc tgcaatattg ttaacgtgag tttagtaaaa ccaacgggtt acgtctactc 26280
gcgtgttaaa aatctgaact cttctgaagg agttcctgat cttctggctt aaacgaacta 26340
actattatta ttattctgtt tggaacttta acattgctta tcatggcaga caacgggtact 26400
attaccgttg aggagcttaa acaactcctg gaacaatgga acctagtaat aggtttccta 26460
ttcctagcct ggattatgtt actacaattt gcctattcta atcggaacag gttttgtac 26520
ataataaagc ttgttttcct ctggctcttg tggccagtaa cacttgcttg ctttgtgctt 26580
gtgctgtct acagaattaa ttgggtgact ggcgggattg cgattgcaat ggctgttatt 26640
gtaggcttga tgtggcttag ctacttcgtt gcttccttca ggctgtttgc tctaccgcgc 26700
tcaatgtggt cattcaaccc agaaacaaac attcttctca atgtgcctct ccgggggaca 26760
attgtgacca gaccgctcat ggaaagtga cttgtcattg gtgctgtgat cattcgtggt 26820
cacttgcgaa tggccggaca ctccctaggg cgctgtgaca ttaaggacct gccaaaagag 26880
atcactgtgg ctacatcacg aacgctttct tattacaaat taggagcgct gcagcgtgta 26940
ggcactgatt caggttttgc tgcatacaac cgctaccgta ttggaaacta taaattaaat 27000
acagaccacg ccggtagcaa cgacaatatt gctttgctag tacagtaagt gacaacagat 27060
gtttcatctt gttgacttcc aggttacaat agcagagata ttgattatca ttatgaggac 27120
tttcaggatt gctatttggg atcttgacgt tataataagt tcaatagtga gacaattatt 27180
taagcctcta actaagaaga attattcgga gttagatgat gaagaaccta tggagttaga 27240
ttatccataa aacgaacatg aaaattattc tcttcctgac attgattgta ttacatctt 27300
gcgagctata tcactatcag gagtgtgtta gaggtacgac tgtactacta aaagaacctt 27360
gcccatcagg aacatacag ggcaattcac catttcaccc tcttgctgac aataaatttg 27420
cactaacttg cactagcaca cactttgctt ttgcttgctg igacgggtact cgacatacct 27480
atcagctgag tgcaagatca gtttcaccaa aacttttcat cagacaagag gaggttcaac 27540
aagagctcta ctgccactt tttctcattg ttgctgctct agtattttta atactttgct 27600
tcaccattaa gagaaagaca gaatgaatga gctcacttta attgacttct atttgtgctt 27660
tttagccttt ctgctattcc ttgttttaat aatgcttatt atattttggt ttactactga 27720
aatccaggat ctagaagaac cttgtaccaa agtctaaacg aacatgaac ttctcattgt 27780
tttgacttgt atttctctat gcagttgcat acgcactgta gtacagcgct gtgcatctaa 27840
taaacctcat gtgcttgaag atccttgtcc tactgggttac caacctgaat ggaatataag 27900
gtacaacact aggggtaata cttatagcac tgcttggtt tgtgctctag gaaaggtttt 27960
accttttcat agatggcaca ctatggttca aacatgcaca cctaagtta ctatcaactg 28020
tcaagatcca gctgggtgtg cgcttatagc taggtgttgg taccttcatg aaggtcacca 28080
aactgtctga tttagagacg tatttgttgt tttaaataaa cgaacaaatt aaaatgtctg 28140
ataatggacc ccaatcaac caacgtagt ccccccgcac tacatttggg ggacccacag 28200
attcaactga caataaccag aatggaggac gcaatggggc aaggccaaa cagcgccgac 28260
cccaagggtt acccaataat actgcgtctt gggtcacagc tctactcag catggcaagg 28320
aggaacttag attccctcga gccagggcg ttccaatcaa caccaatagt ggtccagatg 28380
accaaattgg ctactaccga agagctaccc gacgagttcg tgggtgtgac ggcaaatga 28440

aagagctcag cccagatgg tacttctatt acctaggaac tggcccagaa gcttcacttc 28500
cctacggcgc taacaaagaa ggcatcgtat gggttgcaac tgaggagcc ttgaatacac 28560
ccaaagacca cattggcacc cgcaatccta ataacaatgc tgccaccgtg ctacaacttc 28620
ctcaaggaac aacattgcc aaggtcttct acgcagaggg aagcagaggg ggcagtcaag 28680
cctcttctcg ctcccatca cgtagtcgcg gtaattcaag aaattcaact cctggcagca 28740
gtaggggaaa ttctcctgct cgaatggcta gcggaggtgg tgaaactgcc ctgcgctat 28800
tgctgctaga cagattgaac cagcttgaga gcaaagtctc tggtaaaggc caacaacaac 28860
aaggccaaac tgtactaag aaatctgctg ctgaggcatc taaaaagcct cgccaaaaac 28920
gtactgccac aaaacagtac aacgtcactc aagcatttgg gagacgtggt ccagaacaaa 28980
cccaaggaaa ttctggggac caagacctaa tcagacaagg aactgattac aaacattggc 29040
cgcaaattgc acaatttgc ccaagtgcct ctgcattctt tggaaatgca cgcattggca 29100
tggaagtac accttcggga acatggctga cttatcatgg agccattaaa ttggatgaca 29160
aagatccaca attcaagac aacgtcatac tgctgaacaa gcacattgac gcatacaaaa 29220
cattcccacc aacagagcct aaaaaggaca aaaagaaaaa aactgatgaa gctcagcctt 29280
tgccgcagag acaaaagaag cagcccactg tgactcttct tcctgcggct gacatggatg 29340
atttctccag acaacttcaa aattccatga gtggagcttc tgctgattca actcaggcat 29400
aaacactcat gatgaccaca caaggcagat gggctatgta aacgttttcg caattccgtt 29460
tacgatacat agtctactct tgtgcagaat gaattctcgt aactaaacag cacaagtagg 29520
tttagttaac ttaattctca catagcaatc ttaatacaat gtgtaacatt agggaggact 29580
tgaaagagcc accacatttt catcgaggcc acgcggagta cgatcgaggg tacagtgaat 29640
aatgctaggg agagctgcct atatggaaga gccctaattgt gtaaaattaa ttttagtagt 29700
gctatcccca tgtgatttta atagcttctt aggagaatga caaaa 29745

<210> 2

<211> 29745

<212> RNA

<213> SARS冠状病毒

<400> 2

ctacccagga aaagccaacc aacctcgatc tctttagat ctgttctcta aacgaacttt 60
aaaatctgtg tagctgtcgc tcggctgcat gcctagtga cctacgcagt ataaacaata 120
ataaatttta ctgtcgttga caagaaacga gtaactcgtc cctcttctgc agactgctta 180
cggtttcgtc cgtgttgacg tcgatcatca gcatacctag gtttcgtccg ggtgtgaccg 240
aaaggtgaag tggagagcct tgttcttggg gtcaacgaga aaacacacgt ccaactcagt 300
ttgcctgtcc ttcaggtag agacgtgcta gtgcgtggct tcggggactc tgtggaagag 360
gccctatcgg aggcacgtga acacctcaaa aatggcactt gtggtctagt agagctggaa 420
aaaggcgtac tgcccagct tgaacagccc tatgtgttca ttaaacgttc tgatgcctta 480
agcaccaatc actgccacaa ggtcgttgag ctggttgacg aaatggacgg cattcagtac 540
ggctcgtagc gtataacact gggagtactc gtgccacatg tgggcgaac cccaattgca 600

taccgcaatg ttctttcttcg taagaacggt aataaggag cgggtggtea tagctatggc 660
atcgatctaa agtcttatga cttaggtgac gagcttggca ctgatcccat tgaagattat 720
gaacaaaact ggaacactaa gcatggcagt ggtgcactcc gtgaactcac tctgagctc 780
aatggagggtg cagtcactcg ctatgtcgac aacaatttct gtggcccaga tgggtaccct 840
cttgattgca tcaaagattt tctcgacgc gcgggcaagt caatgtgcac tctttccgaa 900
caacttgatt acatcgagtc gaagagaggt gtctactgct gccgtgacca tgagcatgaa 960
attgcctggt tcaactgagc ctctgataag agctacgagc accagacacc cttcgaaatt 1020
aagagtcca agaaatttga cactttcaaa gggaatgcc caaagttgt gtttcctctt 1080
aactcaaaag tcaaagtcac tcaaccacgt gttgaaaaga aaaagactga gggtttcacg 1140
gggcgtatc gctctgtgta ccctgttgca tctccacagg agtgaacaa catgcacttg 1200
tctaccttga tgaatgtaa tcattcgat gaagtttcac ggcagacgtg cgactttctg 1260
aaagccactt gtgaacattg tggcactgaa aatttagtta ttgaaggacc tactacatgt 1320
gggtacctac ctactaatgc ttagtgaaa atgccatgtc ctgcctgtca agaccagag 1380
attggacctg agcatagtgt tgcagattat cacaaccact caaacattga aactcgactc 1440
cgcaaggag gtaggactag atgttttga ggctgtgtgt ttgcctatgt tggctgctat 1500
aataagcgtg cctactgggt tctcgtgct agtctgata ttggctcagg ccatactggc 1560
attactggtg acaatgtgga gaccttgaat gaggatctcc ttgagatact gagtcgtgaa 1620
cgtgttaaca ttaacattgt tggcgatttt catttgaatg aagaggttgc catcattttg 1680
gcctctttct ctgcttctac aagtgccttt attgacacta taaagagtct tgattacaag 1740
tctttcaaaa ccattgttga gtctgcggt aactataaag ttaccaaggg aaagcccgtg 1800
aaagtgctt ggaacattgg acaacagaga tcagttttaa caccactgtg tggttttccc 1860
tcacaggctg ctggtgttat cagatcaatt ttgcgcgca cacttgatgc agcaaaccac 1920
tcaattcctg atttgcaag agcagctgtc accatacttg atggtatttc tgaacagtca 1980
ttacgtcttg tcgacgccat gttttatact tcagacctgc tcaccaacag tgcattatt 2040
atggcatatg taactggtgg tcttgtaaca cagacttctc agtggttgc taatcttttg 2100
ggcactactg ttgaaaaact caggcctatc tttgaatgga ttgaggcgaa acttagtgca 2160
ggagtgaat ttctcaagga tgcttgggag attctcaaat ttctcattac aggtgttttt 2220
gacatcgta agggtcfaat acaggttgct tcagataaca tcaaggattg tgtaaaatgc 2280
ttcattgatg ttgttaacaa ggcactcgaa atgtgcattg atcaagtcac tatcgctggc 2340
gcaaagtgc gatcactcaa cttaggtgaa gtcttcacgc ctcaaagcaa gggactttac 2400
cgtcagtga tacgtggcaa ggagcagctg caactactca tgcctctta ggcacaaaaa 2460
gaagtaacct ttcttgaagg tgattcacat gacacagtac ttacctctga ggaggttgtt 2520
ctcaagaacg gtgaactcga agcactcgag acgcccgtt atagcttcac aaatggagct 2580
atcgttggca caccagtctg tgtaaatggc ctcatgctct tagagattaa ggacaaagaa 2640
caatactgag cattgtctcc tggtttactg gctacaaaca atgtctttcg cttaaaaggg 2700
gggtcaccaa ttaaagggtg aacctttgga gaagatactg tttgggaagt tcaaggttac 2760
aagaatgtga gaatcacatt tgagcttgat gaacgtgtt acaaagtgt taatgaaaag 2820
tgctctgtct acactgttga atccggtacc gaagtactg agtttgcacg tgtttagca 2880

gaggctgttg tgaagacttt acaaccagtt tctgatctcc ttaccaacat gggatttgat 2940
cttgatgagt ggagtgtagc tacattctac ttatttgatg atgctgtgta agaaaacttt 3000
tcacacgta tgtattgttc cttttaccct ccagatgagg aagaagagga cgatgcagag 3060
tgtgaggaag aagaaattga tgaaacctgt gaacatgagt acggtacaga ggatgattat 3120
caaggtctcc ctctggaatt tggcgctca gctgaaacag ttcgagtga ggaagaagaa 3180
gaggaagact ggctggatga tactactgag caatcagaga ttgagccaga accagaacct 3240
acacctgaag aaccagttaa tcagtttact ggttatttaa aacttactga caatgttgcc 3300
attaaatgtg ctgacatcgt taaggaggca caaagtgcta atcctatggt gattgttaat 3360
gctgctaaca tacacctgaa acatgggtgtt ggtgtagcag gtgactcaa caaggcaacc 3420
aatgggtcca tgcaaaagga gagtgatgat tacattaagc taaatggccc tcttacagta 3480
ggagggtctt gtttgcttc tggacataat ctigctaaga agtgtctgca tgttgttgga 3540
cctaacctaa atgcaggta ggacatccag ctcttaagg cagcatatga aaatttcaat 3600
tcacaggaca cttacttgc accattgttg tcagcaggca tatttggtgc taaaccactt 3660
cagtctttac aagtgtcgt gcagacggtt cgtacacagg tttatattgc agtcaatgac 3720
aaagctcttt atgagcaggt tgtcatggt tatcttgata acctgaagcc tagagtggaa 3780
gcacctaaac aagaggagcc accaaacaca gaagattcca aaactgagga gaaatctgtc 3840
gtacagaagc ctgtcgatgt gaagccaaaa attaaggcct gcattgatga ggttaccaca 3900
acactggaag aaactaagtt tcttaccat aagtactct tgtttgctga tatcaatggt 3960
aagctttacc atgattctca gaacatgctt agagggtgaag atatgtcttt ccttgagaag 4020
gatgcacctt acatggtagg tgatgttatc actagtgtg atatcacttg tgttgtaata 4080
ccctccaaaa aggcgtgttg cactactgag atgctctcaa gagctttgaa gaaagtgcc 4140
gttgatgagt atataaccac gtacctgga caaggatgtg ctggttatac acttgaggaa 4200
gctaggactg ctcttaagaa atgcaaatct gcattttatg tactaccttc agaagcacct 4260
aatgctaagg aagagattct aggaactgta tcctggaatt tgagagaaat gcttgctcat 4320
gctgaagaga caagaaaatt aatgcctata tgcattgatg ttgagccat aatggcaacc 4380
atccaacgta agtataaagg aattaaaatt caagagggca tcgttgacta tgggtgccga 4440
ttcttctttt atactagtaa agagcctgta gcttctatta ttacgaagct gaactctcta 4500
aatgagccgc ttgtcacaat gccaatgtt tatgtgacac atggttttaa tcttgaagag 4560
gctgcgcgct gtatgcgttc tcttaaagct cctgccgtag tgcagtatc atcaccagat 4620
gctgttacta catataatgg atacctcact tcgtcatcaa agacatctga ggagcacttt 4680
gtagaaacag tttctttggc tggctcttac agagattggt cctattcagg acagcgtaca 4740
gagttagggt ttgaatttct taagcgtggt gacaaaattg tgtaccacac tctggagagc 4800
cccgtcagat ttcatttga cggtagggt ctttacttg acaactaaa gagtctctta 4860
tccctgcggg aggttaagac tataaaagt ttcacaactg tggacaacac taatctccac 4920
acacagcttg tggatatgtc tatgacatat ggacagcagt ttggtccaac atacttggt 4980
ggtgtgatg ttacaaaaat taaacctcat gtaaatcatg agggtaagac tttctttgta 5040
ctacctagt atgacacact acgtagtga gctttcgagt actaccatac tcttgatgag 5100
agttttcttg gtaggtacat gtctgcttta aaccacacaa agaaatggaa atttctcaa 5160

gttgggtggtt taacttcaat taaatgggct gataacaatt gttatttgtc tagtggttta 5220
 ttagcacttc aacagattga agtcaaattc aatgcaccag cacttcaaga ggcttattat 5280
 agagcccggtg ctggatgatc tgetaacitt tgtgcaacta tactcgctta cagtaataaa 5340
 actgttggcg agcttgggtga tgtcagagaa actatgaccc atcttctaca gcatgctaatt 5400
 ttggaatctg caaagcgagt tcttaatgtg gtgtgtaaac attgtgggtca gaaaactact 5460
 accttaacgg gtgtagaagc tgtgatgtat atgggtactc tatcttatga taatcttaag 5520
 acaggtgttt ccattccatg tgtgtgtggt cgtgatgcta cacaatatct agtacaacaa 5580
 gagtcttctt ttgttatgat gtctgcacca cctgctgagt ataaattaca gcaaggtaca 5640
 ttcttatgtg cgaatgagta cactggtaac tatcagtgtg gtcattacac tcatataact 5700
 gctaaggaga ccctctatcg tattgacgga gtcacctta caaagatgtc agagtacaaa 5760
 ggaccagtga ctgatgtttt ctacaaggaa acatcttaca ctacaacat caagcctgtg 5820
 tcgtataaac tcgatggagt tacttacaca gagattgaac caaaattgga tgggtattat 5880
 aaaaaggata atgcttacta tacagagcag cctatagacc ttgtaccaac tcaaccatta 5940
 ccaaatgcga gttttgataa tticaaactc acatgttcta acacaaaatt tgctgatgat 6000
 ttaaatcaaa tgacaggctt cacaagcca gcttcacgag agctatctgt cacattcttc 6060
 ccagacttga atggcgatgt agtggctatt gactatagac actattcagc gagtttcaag 6120
 aaaggtgcta aattactgca taagccaatt gtttggcaca ttaaccaggc tacaaccaag 6180
 acaacgttca aaccaaacac ttgggtgtta cgttgtcttt ggagtacaaa gccagtagat 6240
 acttcaaatt catttgaagt tctggcagta gaagacacac aaggaatgga caatcttgct 6300
 tgtgaaagtc aacaaccac cctgaagaa gtagtggaat atcctaccat acagaaggaa 6360
 gtcataagat gtgacgtgaa aactaccgaa gtgtaggca atgtcatact taaaccatca 6420
 gatgaagggtg ttaaagtaac acaagagta ggtcatgagg atcttatgac tgcttatgtg 6480
 gaaaacacaa gcattaccat taagaaacct aatgagcttt cactagcctt aggtttaaaa 6540
 acaattgcc aatctggtat tgctgcaatt aatagtgtc cttggagtaa aatttttgct 6600
 tatgtcaaac cattcttagg acaagcagca attacaacat caaattgcgc taagagatta 6660
 gcacaacgtg tgtttaacaa ttatatgcct tatgtgttta cattattgtt ccaattgtgt 6720
 acttttacta aaagtaccaa ttctagaatt agagcttcac tacctacaac tattgctaaa 6780
 aatagtgtta agagtgttc taaattatgt ttggatgccg gcattaatta tgtgaagtca 6840
 cccaaatttt cttaaattgtt cacaatcgct atgtggctat tgttgtaag tatttgctta 6900
 ggttctctaa tctatgtaac tgctgctttt ggtgtactct tatctaattt tgggtgctct 6960
 tcttattgta atggcggttag agaattgtat cttaatcgt ctaacgttac tactatggat 7020
 ttctgtgaag gttcttttcc ttgcagcatt tgtttaagt gattagactc ccttgattct 7080
 tatccagctc ttgaaacat tcagggtgacg atttcacgt acaagctaga cttgacaatt 7140
 ttaggtctgg ccgctgagt ggttttgga tatatgttgt tcacaaaatt cttttattta 7200
 ttaggtcttt cagctataat gcagggtgtc ttggctatt ttgctagtca ttcatcagc 7260
 aattcttggc tcatgtggtt tatcattagt attgtacaaa tggcaccggt ttctgcaatg 7320
 gttaggatgt acatcttctt tgcttcttcc tactacatat ggaagagcta tgttcatac 7380
 atggatggtt gcacctcttc gacttgcag atgtgctata agcgcaatcg tgccacacgc 7440

gttgagtga caactattgt taatggcatg aagagatctt tctatgtcta tgcaaatgga 7500
 ggccgtggct tctgcaagac tcacaattgg aattgtctca attgtgacac attttgact 7560
 ggtagtacat tcattagtga tgaagttgct cgtgatttgt cactccagtt taaaagacca 7620
 atcaacccta ctgaccagtc atcgtatatt gttgatagtg ttgctgtgaa aaatggcgcg 7680
 cttcacctct actttgacaa ggctggctaa aagacctatg agagacatcc gctctcccat 7740
 tttgtcaatt tagacaattt gagagctaac aacactaaag gttcactgcc tattaatgtc 7800
 atagtttttg atggcaagtc caaatgcgac gagtctgctt ctaagtctgc ttctgtgtac 7860
 tacagtcagc tgatgtgcca acctattctg ttgcttgacc aagctcttgt atcagacgtt 7920
 ggagatagta ctgaagtttc cgtaagatg tttgatgctt atgtcgacac cttttcagca 7980
 acttttagtg ttccctatgga aaaacttaag gcacttggtg ctacagctca cagcgagtta 8040
 gcaaaggggtg tagctttaga tgggtgcctt tctacattcg tgtcagctgc cgcacaaggt 8100
 gttgttgata ccgatgttga cacaaaggat gttattgaat gtctcaaact ttcacatcac 8160
 tctgacttag aatgacaggt tgacagttgt aacaatttca tgctcaccta taataaggtt 8220
 gaaaacatga cccccagaga tcttggcgca tgtattgact gtaatgcaag gcatatcaat 8280
 gcccagtag caaaaagtca caatgtttca ctcatctgga atgtaaaaga ctacatgtct 8340
 ttatctgaac agctgcgtaa acaaattcgt agtgctgcca agaagaacaa catacctttt 8400
 agactaactt gtgtacaaac tagacaggtt gtcaatgtca taactactaa aatctcactc 8460
 aagggttgta agattgttag tacttggttt aaacttatgc ttaaggccac attattgtgc 8520
 gttcttgcg cattggtttg ttacatcggt atgccagtac atacattgtc aatccatgat 8580
 ggttacacaa atgaatcat tggttacaaa gccattcagg atgggtgcac tcgtgacatc 8640
 atttctactg atgattgttt tgcaataaa catgctgggt ttgacgcatg gtttagccag 8700
 cgtgggtggt catacaaaaa tgacaaaagc tgccctgtag tagctgctat cattacaaga 8760
 gagattggtt tcatagtgc tggtttaccg ggtactgtgt tgagagcaat caatggtgac 8820
 ttcttgcatt ttctacctcg tgtttttagt gctgttgcca acatttgcta cacaccttc 8880
 aaactcattg agtatagtga ttttctacc tctgcttgcg ttcttgcgc agagtgtaca 8940
 atttttaagg atgctatggg caaacctgtg ccatattgtt atgacactaa ttgctagag 9000
 ggttctattt ctatagtga gttctgtcca gacactcggt atgtgcitat ggatggttcc 9060
 atcatacagt ttctaacat ttacctggag ggttctgtta gagtagtaac aacttttgat 9120
 gctgagtact gtagacatgg tacatgcgaa aggtcagaag caggtatttg cctatctacc 9180
 agtggtagat gggttcttaa taatgagcat tacagagctc tatcaggagt ttctgtggt 9240
 gttgatgcga tgaatctcat agctaacatc ttactcctc ttgtgcaacc tgtgggtgct 9300
 ttagatgtgt ctgcttcagt agtggctggt ggtattattg ccatattggt gacttgtgct 9360
 gcctactact ttatgaaatt cagacgtgct tttggtgagt acaacatgt tgttgcgtct 9420
 aatgcacttt tgtttttgat gtctttcact atactctgtc tggcaccage ttacagcttt 9480
 ctgccgggag tctactcagt cttttacttg tacttgacat tetatttcac caatgatgtt 9540
 tcattcttgg ctacacctca atggtttgcc atgtttctc ctattgtgcc tttttggata 9600
 acagcaatct atgtattctg ttttctctg aagcactgcc attggttctt taacaactat 9660
 cttaggaaaa gagtcatgtt taatggagtt acatttagta ccttcgagga ggctgcttgc 9720

tgtacctttt tgctcaacaa ggaatgtac ctaaaattgc gtagcgagac actgttgcca 9780
 cttacacagt ataacaggta tcttgctcta tataacaagt acaagtattt cagtggagcc 9840
 ttagatacta ccagctatcg tgaagcagct tgctgccact tagcaaaggc tctaaatgac 9900
 ttttagcaact cagggtctga tgttctctac caaccaccac agacatcaat cacttctgct 9960
 gttctgcaga gtggttttag gaaaatggca ttcccgtcag gcaaagtga aggatgcatg 10020
 gtacaagtaa cctgtggaac tacaactctt aatggattgt ggttggatga cacagtatac 10080
 tgtccaagac atgtcatttg cacagcagaa gacatgctta atcctaacta tgaagatctg 10140
 ctcatcgcga aatccaacca tagctttctt gttcaggctg gcaatgttca acttcgtgtt 10200
 attgccatt ctatgcaaaa ttgtctgctt aggcttaaag ttgatacttc taaccctaag 10260
 acaccaagt ataaatttgt ccgtatccaa cctgggtcaa cattttcagt tctagcatgc 10320
 tacaatggtt caccatctgg tgtttatcag tgtgcatga gacctaatca taccattaaa 10380
 gggtctttcc ttaatggatc atgtggtagt gttggtttta acattgatta tgattgctg 10440
 tctttctgct atatgcatca tatggagctt ccaacaggag tacacgctgg tactgactta 10500
 gaaggtaaat tctatggctc atttgttgac agacaaactg cacagctgc aggtacagac 10560
 acaaccataa cattaaatgt ttggcatgg ctgtatgctg ctgttatcaa tggatagagg 10620
 tggtttctta atagattcac cactactttg aatgacttta accttgtggc aatgaagtac 10680
 aactatgaac cttgacaca agatcatgtt gacatattgg gacctcttc tgctcaaaaa 10740
 ggaattgccg tcttagatat gtgtgctgct ttgaaagagc tgctgcagaa tggatgaat 10800
 ggtcgtacta tccttggtag cactatttta gaagatgagt ttacaccatt tgatgttgtt 10860
 agacaatgct ctggtgttac ctccaaggt aagtcaaga aaattgttaa gggcactcat 10920
 cattggatgc ttttaacttt ctgacatca ctattgattc ttgttcaaag tacacagtgg 10980
 tcactgtttt tctttgttta cgagaatgct ttcttgccat ttactcttgg tattatggca 11040
 attgctgcat gtgctatgct gcttgttaag cataagcacg cattcttctg cttgtttctg 11100
 ttacctctc ttgcaacagt tgettacttt aatatggctc acatgcctgc tagctgggtg 11160
 atgcgtatca tgacatggct tgaattggct gacactagct tgtctggta taggcttaag 11220
 gattgtgta tgatgcttc agcttttagt ttgcttattc tcatgacagc tcgcactgtt 11280
 tatgatgatg ctgctagacg tgtttggaca ctgatgaatg tcattacact tgtttacaaa 11340
 gtctactatg gtaatgcttt agatcaagct atttccatgt gggccttagt tatttctgta 11400
 acctctaact attctggtgt cgttacgact atcatgtttt tagctagagc tatagtgttt 11460
 gtgtgtgttg agtattacc attgttattt attactggca acacettaca gtgtatcatg 11520
 cttgtttatt gtttcttagg ctattgttgc tgctgctact ttggcctttt ctgtttactc 11580
 aaccgttact tcaggcttac tcttgggttt tatgactact tggctcttac acaagaattt 11640
 aggtatatga actcccagg gcttttgct cctaagagta gtattgatgc tticaagctt 11700
 aacattaagt tgttgggtat tggaggtaaa ccatgtatca aggttgctac tgtacagtct 11760
 aaaatgtctg acgtaaagt cacatctgtg gtactgctct cggttcttca acaacttaga 11820
 gtagagtcatt ctctaaatt gtgggcacaa tgtgtacaac tccacaatga tattcttctt 11880
 gcaaaagaca caactgaagc ttctgagaag atggtttctc ttttgtctgt tttgctatcc 11940
 atgcagggtg ctgtagacat taataggttg tgcgaggaaa tgctcgataa ccgtgctact 12000

cttcaggcta ttgcttcaga atttagttct ttaccatcat atgccgctta tgccactgcc 12060
 caggaggcct atgagcaggc tgtagctaat ggtgattctg aagtcgttct caaaaagtta 12120
 aagaaatctt tgaatgtggc taaatctgag ttigaccgtg atgctgccat gcaacgcaag 12180
 ttggaaaaga tggcagatca ggctatgacc caaatgtaca aacaggcaag atctgaggac 12240
 aagagggcaa aagtaactag tgctatgcaa acaatgctct tcactatgct taggaagctt 12300
 gataatgatg cacttaacaa cattatcaac aatgcgcgtg atggttgtgt tccactcaac 12360
 atcataccat tgactacagc agccaaactc atggttgttg tccctgatta tggtagctac 12420
 aagaacactt gtgatggtaa cacctttaca tatgcatctg cactctggga aatccagcaa 12480
 gttgttgatg cggatagcaa gattgttcaa cttagtgaat ttaacatgga caattcacca 12540
 aatttggctt ggccctctat tgttacagct ctaagagcca actcagctgt taaactacag 12600
 aataatgaac tgagtccagt agcactacga cagatgtcct gtgcggctgg taccacacaa 12660
 acagcttgta ctgatgcaa tgcacttgcc tactataaca attcgaaggg aggtagggtt 12720
 gtgctggcat tactatcaga ccaccaagat ctcaaagggt ctagattccc taagagtgat 12780
 ggtacaggta caatttacac agaactggaa ccaccttgta gggttgttac agacacacca 12840
 aaagggccta aagtgaata cttgtacttc atcaaaggct taaacaacct aaatagaggt 12900
 atggtgctgg gcagtttagc tgctacagta cgtcttcagg ctggaaatgc tacagaagta 12960
 cctgccaat caactgtgct ttccttctgt gcttttgtag tagacctgc taaagcatat 13020
 aaggattacc tagcaagtgg aggacaacca atcaccaact gtgtgaagat gttgtgtaca 13080
 cacactggta caggacaggc aattactgta acaccagaag ctaacatgga ccaagagtc 13140
 tttgggtgtg cttcatgttg tctgtattgt agatgccaca ttgacctcc aaatcctaaa 13200
 ggattctgtg acttgaaagg taagtacgtc caaataccta ccacttgtag taatgacca 13260
 gtgggtttta cacttagaaa cacagtctgt accgtctgag gaatgtggaa aggttatggc 13320
 ttagttgtg accaactccg cgaacccttg atgcagtctg cggatgcac aacgttttta 13380
 aacgggtttg cgggtgaagt gcagcccgctc ttacaccgtg cggcacaggc actagtactg 13440
 atgtcgtcta cagggtttt gatatttaca acgaaaaagt tgctggtttt gcaaagttcc 13500
 taaaaactaa ttgtctgctc ttccaggaga aggatgagga aggcaattta ttagactctt 13560
 acttttagt taagaggcat actatgtcta actaccaaca tgaagagact atttataact 13620
 tggttaaaga ttgtccagcg gttgtgtcc atgactttt caagtttaga gtagatggtg 13680
 acatggtacc acatatatca cgtcagcgtc taactaaata cacaatggct gatttagtct 13740
 atgctctacg tcattttgat gagggttaatt gtgatacatt aaaagaaata ctcgtcacat 13800
 acaattgctg tgatgatgat tatttcaata agaaggattg gtatgacttc gtagagaatc 13860
 ctgacatctt acgcgtatat gtaacttag gtgagcgtgt acgccaatca ttattaaaga 13920
 ctgtacaatt ctgcgatgct atgcgtgatg caggcattgt aggcgtactg acattagata 13980
 atcaggatct taatgggaac tggtagcatt tcggtgattt cgtacaagta gcaccaggct 14040
 gcggagtccc tatttggtat tcattattct cattgtgat gccatcctc actttgacta 14100
 gggcattggc tgctgagtcc catatggatg ctgatctcgc aaaaccactt attaatggg 14160
 atttctgaa atatgattt acggaagaga gactttgtct cttcgaccgt tattttaaat 14220
 attgggacca gacataccat cccaattgta ttaactgttt ggatgatagg tgtatccttc 14280

attgtgcaaa cttaaatgtg ttattttcta ctgtgtttcc acctacaagt tttggaccac 14340
tagtaagaaa aatatttgta gatggtgttc cttttgttgt ttcaactgga taccattttc 14400
gtgagttagg agtcgtacat aatcaggatg taaacttaca tagctcgcgt ctcagtttca 14460
aggaactttt agtgtatgct gctgatccag ctatgcatgc agcttctggc aatttattgc 14520
tagataaacg cactacatgc ttttcagtag ctgcactaac aaacaatgtt gcttttcaaa 14580
ctgtcaaacc cggtaatttt aataaagact tttatgactt tgctgtgtct aaaggtttct 14640
ttaaggaagg aagtctgtt gaactaaaac acttcttctt tgctcaggat ggcaacgctg 14700
ctatcagtga ttatgactat tatcgttata atctgccaac aatgtgtgat atcagacaac 14760
tcctattcgt agttgaagtt gttgataaat actttgattg ttacgatggt ggctgtatta 14820
atgccacca agtaatcgtt aacaatctgg ataatcagc tggtttccca tttaataaat 14880
ggggaaggc tagactttat tatgactcaa tgagttatga ggatcaagat gcacttttcg 14940
cgtatactaa gcgtaatgtc atccctacta taactcaaat gaatcttaag tatgccatta 15000
gtgcaaagaa tagagctcgc accgtagctg gtgtctctat ctgtagtact atgacaaata 15060
gacagtttca tcagaaatta ttgaagtcaa tagccgccac tagaggagct actgtggtaa 15120
ttggaacaag caagttttac ggtggctggc ataatatgtt aaaaactgtt tacagtgatg 15180
tagaaactcc acaccttatg ggttgggatt atccaaaatg tgacagagcc atgcctaaca 15240
tgcttaggat aatggcctct cttgttcttg ctgcaaaca taacacttgc tgtaacttat 15300
cacaccgttt ctacaggtta gctaacgagt gtgcgcaagt attaagttag atggtcatgt 15360
gtggcggctc actatatgtt aaaccaggtg gaacatcatc cggatgatgt acaactgtt 15420
atgctaatag tgtctttaac atttgtcaag ctgttacagc caatgtaaat gcacttcttt 15480
caactgatgg taataagata gctgacaagt atgtccgcaa tctacaacac aggctctatg 15540
agtgctctta tagaaatagg gatgtgatc atgaattcgt ggatgagttt tacgcttacc 15600
tgcgtaaaaa tttctccatg atgattcttt ctgatgatgc cgttgtgtgc tataacagta 15660
actatgcggc tcaaggttta gttagtagca ttaagaactt taaggcagtt ctttattatc 15720
aaaataatgt gttcatgtct gaggcaaaat gttggactga gactgacctt actaaaggac 15780
ctcaggaatt ttgtcacag catacaatgc tagttaaaca aggagatgat tacgtgtacc 15840
tgcttaccac agatccatca agaataatag gcgcaggctg ttttgtcgat gatattgtca 15900
aaacagatgg tacacttatg attgaaaggt tcgtgtcact ggctattgat gcttaccac 15960
ttacaaaaca tcctaatcag gagtatgctg atgtctttca cttgtattta caatacatta 16020
gaaagttaca tgatgagctt actggccaca tgttgacat gtattccgta atgctaacta 16080
atgataacac ctcacggtac tgggaacctg agttttatga ggctatgtac acaccacata 16140
cagtcttgca ggctgtaggt gcttgtgtat tgtgcaattc acagacttca cttcgttgcg 16200
gtgcctgtat taggagacca ttcctatgtt gcaagtctg ctatgacat gtcatttcaa 16260
catcacacaa attagtgtt tctgttaatc cctatgtttg caatgcccc ggttgtgatg 16320
tcaactgatg gacacaactg tatctaggag gtatgagcta ttattgcaag tcacataagc 16380
ctcccattag ttttccatta tgtgctaatt gtcaggtttt tggtttatac aaaaacacat 16440
gtgtaggcag tgacaatgtc actgacttca atcgatagc aacatgtgat tggactaatg 16500
ctggcgatta catacttgcc aacacttgta ctgagagact caagcttttc gcagcagaaa 16560

cgctcaaagc cactgaggaa acatttaagc tgtcatatgg tattgccact gtacgcgaag 16620
 tactctctga cagagaattg catctttcat gggagggttg aaaacctaga ccaccattga 16680
 acagaaacta tgtctttact ggttaccgtg taactaaaaa tagtaaagta cagattggag 16740
 agtacacctt tgaaaaagggt gactatgggtg atgctgttgt gtacagaggt actacgacat 16800
 acaagttgaa tgttgggtgat tactttgtgt tgacatctca cactgtaatg ccacttagtg 16860
 cacctactct agtgccacaa gagcactatg tgagaattac tggtttgtac ccaacactca 16920
 acatctcaga tgagttttct agcaatgttg caaattatca aaaggtcggc atgcaaaagt 16980
 actctacact ccaaggacca cctggtagtg gtaagagtca ttttgccatc ggacttgctc 17040
 tctattaccc atctgctcgc atagtgtata cggcatgctc tcatgcagct gttgatgccc 17100
 tatgtgaaaa ggcatacaaa tttttgccc tagataaatg tagtagaatc atacctgcgc 17160
 gtgcgcgcgt agagtgtttt gataaattca aagtgaattc aacactagaa cagtatgttt 17220
 tctgcaactg aaatgcattg ccagaaacaa ctgctgacat ttagtcttt gatgaaatct 17280
 ctatggctac taattatgac ttgagtgtg tcaatgctag acttcgtgca aaacactacg 17340
 tctatattgg cgatcctgct caattaccag cccccgcac attgctgact aaaggcacac 17400
 tagaaccaga atattttaat tcagtgtgca gacttatgaa aacaataggt ccagacatgt 17460
 tccttggaa tttgtcgcgt tgtcctgctg aaattgtga cactgtgagt gcttttagttt 17520
 atgacaataa gctaaaagca cacaaggaga agtcagctca atgcttcaa atgttctaca 17580
 aaggtgttat tacacatgat gtttcatctg caatcaacag acctcaaata ggcgttgtaa 17640
 gagaatttct tacacgcaat cctgcttgga gaaaagctgt ttttatctca cttataaatt 17700
 cacagaacgc ttagcttica aaaatcttag gattgectac gcagactgtt gattcatcac 17760
 agggttctga atatgactat gtcatattca cacaactac tgaacagca cactcttgta 17820
 atgtcaaccg cttaaatgtg gctatcaca gggcaaaaat tggcattttg tgcataatgt 17880
 ctgatagaga tctttatgac aaactgcaat ttacaagtct agaaatacca cgtcgcaatg 17940
 tggctacatt acaagcagaa aatgtaactg gactttttaa ggactgtagt aagatcatta 18000
 ctggtcttca tcctacacag gcacctacac acctcagcgt tgatataaag ttcaagactg 18060
 aaggattatg tgttgacata ccaggcatac caaaggacat gacctaccgt agactcatct 18120
 ctatgatggg ttcaaaaatg aattaccaag tcaatggta ccctaatatg tttatcacc 18180
 gcgaagaagc tattcgctac gtctgtcgtt ggattggctt tgatgtagag ggctgtcatg 18240
 caactagaga tgctgtgggt actaacctac ctctccagct aggttttct acagggtgta 18300
 acttagtagc tgtaccgact ggttatgttg aactgaaaa taacacagaa ttcaccagag 18360
 ttaatgcaa acctccacca ggtgaccagt ttaaacatct tataccactc atgtataaag 18420
 gcttgccctg gaatgtagt cgtattaaga tagtacaat gctcagtgt aactgaaag 18480
 gattgtcaga cagagtcgtg ttcgtccttt gggcgcatgg ctttgagctt acatcaatga 18540
 agtactttgt caagattgga cctgaaagaa cgtgttgtct gtgtgacaaa cgtgcaactt 18600
 gcttttctac ttcacagat acttatgcct gctggaatca ttctgtgggt tttgactatg 18660
 tctatacccc atttatgatt gatgttcagc agtggggctt tacgggtaac cttcagagta 18720
 accatgacca acattgccag gtacatggaa atgcacatgt ggctagtgt gatgctatca 18780
 tgactagatg tttagcagtc catgagtgt ttgttaagcg cgttgattgg tctgttgaat 18840

accctattat aggagatgaa ctgagggtta attctgcttg cagaaaagta caacacatgg 18900
 ttgtgaagtc tgcattgctt gctgataagt ttccagttct tcatgacatt ggaaatccaa 18960
 aggctatcaa gtgtgtgcct caggctgaag tagaatggaa gttctacgat gctcagccat 19020
 gtagtgacaa agcttacaaa atagaggaac tcttctattc ttatgtaca catcacgata 19080
 aattcactga tgggttttgt ttgttttga attgtaacgt tgatcggttac ccagccaatg 19140
 caattgtgtg taggtttgac acaagagtct tgtcaaactt gaacttacca ggctgtgatg 19200
 gtggtagttt gtatgtgaat aagcatgcat tccacactcc agctttcgat aaaagtgcat 19260
 ttactaattt aaagcaattg cttttctttt actattctga tagtccttgt gagtctcatg 19320
 gcaacaagt agtgtcggat attgattatg ttccactcaa atctgctacg tgtattacac 19380
 gatgcaattt aggtgggtgct gtttgacagc accatgcaaa tgagtaccga cagtacttgg 19440
 atgcataata tatgatgatt tctgctggat ttagcctatg gatttacaaa caatttgata 19500
 cttataacct gtggaataca ttaccaggt tacagagttt agaaaatgtg gcttataatg 19560
 ttgttaataa aggacacttt gatggacacg ccggcgaagc acctgtttcc atcattaata 19620
 atgctgttta cacaaaggtg gatggatttg atgtggagat ctttgaaaat aagacaacac 19680
 ttctgttaa tgttgcatth gagcttttggg ctaagcgtaa cattaaacca gtgccagaga 19740
 ttaagatact caataatttg ggtgttgata tcgctgctaa tactgtaatc tgggactaca 19800
 aaagagaagc cccagcacat gtatctacaa taggtgtctg cacaatgact gacattgcca 19860
 agaaacctac tgagagtgtc tgttcttcac ttactgtctt gtttgatggt agagtggaag 19920
 gacaggtaga cttttttaga aacgcccgtg atgggtgttt aataacagaa ggttcagtca 19980
 aaggtctaac accttcaaag ggaccagcac aagctagcgt caatggagtc acattaattg 20040
 gagaatcagt aaaaacacag tttaactact ttaagaaagt agacggcatt attcaacagt 20100
 tgctgaaac ctactttact cagagcagag acttagagga ttttaagccc agatcacaaa 20160
 tggaaactga ctttctcgag ctgctatgg atgaattcat acagcgatat aagctcgagg 20220
 gctatgcctt cgaacacatc gtttatggag atttcagtca tggacaactt ggcgggtctt 20280
 atttaatgat aggttagcc aagcgctcac aagattcacc acttaaatga gaggatttta 20340
 tccctatgga cagcacagtg aaaaattact tcataacaga tgcgcaaaca ggttcatcaa 20400
 aatgtgtgtg ttctgtgatt gatcttttac ttgatgactt tgtcgagata ataaagtcac 20460
 aagatttgtc agtgatttca aaagtgggtc aggttacaat tgactatgct gaaatttcat 20520
 tcatgctttg gtgtaaggat ggacatgttg aaaccttcta cccaaaacta caagcaagtc 20580
 aagcgtggca accaggtgtt gcgatgccta acttgtaaa gatgcaaaga atgcttcttg 20640
 aaaagtgtga ctttcagaat tatggtgaaa atgctgttat accaaaagga ataattgatg 20700
 atgtcgcaaa gtatactcaa ctgtgtcaat acttaaatc acttacttta gctgtaccct 20760
 acaacatgag agttattcac ttgtgtgtg gctctgataa aggagttgca ccaggtacag 20820
 ctgtactcag acaatggttg ccaactggca cactacttgt cgattcagat cttaatgact 20880
 tcgtctccga cgcagattct actttaattg gagactgtgc aacagtacat acggctaata 20940
 aatgggacct tattattagc gatatgtatg accctaagac caaacatgtg acaaaagaga 21000
 atgactctaa agaaggggtt ttacttattc tgtgtggatt tataaagcaa aaactagccc 21060
 tgggtgggtc tatagctgta aagataacag agcattcttg gaatgctgac ctttacaagc 21120

ttatgggcca ttctcatgg tggacagctt ttgttacaaa tgtaaatgca tcatcatcgg 21180
 aagcattttt aattggggct aactatcttg gcaagccgaa ggaacaaatt gatggctata 21240
 ccattgcatgc taactacatt ttctggagga acacaaatcc tatccagttg tcttcctatt 21300
 cactctttga catgagcaaa ttctctctta aattaagagg aactgctgta atgtctctta 21360
 aggagaatca aatcaatgat atgatttatt ctcttctgga aaaaggtagg cttatcatta 21420
 gagaaaacaa cagagttgtg gtttcaagt atattcttgt taataactaa acgaacatgt 21480
 ttattttctt attatttctt actctcacta gtggtagtga ccttgaccgg tgcaccactt 21540
 ttgatgatgt tcaagctcct aattacactc aacatacttc atctatgagg ggggtttact 21600
 atcctgatga aatttttaga tcagacactc tttattnaac tcaggattta tttcttccat 21660
 tttattctaa tgttacaggg ttctacta ttaatcatc gtttgacaac cctgtcatc 21720
 cttttaagga tggattttat ttgctgcca cagagaaatc aaatgtgtc cgtggttggg 21780
 tttttgttc taccatgaac aacaagtcac agtcggtgat tattattaac aattctacta 21840
 atgttgttat acgagcatgt aactttgaat tgtgtgacaa ccccttcttt gctgtttcta 21900
 aacccatggg tacacagaca catactatga tattcgataa tgcatttaac tgcactttcg 21960
 agtacatc tcatgctctt tcgcttgatg ttccagaaaa gtcaggtaac ttttaacact 22020
 tacgagagtt tgtgtttaa aataaagatg ggtttctcta tgtttataag ggctatcaac 22080
 ctatagatgt agttcgtgat ctacctctg ttttaacac ttgaaaccc atttttaagt 22140
 tgcctcttgg tattaacatt acaaatttta gagccattct tacagccttt ttacctgctc 22200
 aagacacttg gggcacgtca gctgcagcct atttgttgg ctatttaag ccaactacat 22260
 ttatgctcaa gtatgatga aatggtacaa tcacagatgc tgttgattgt tctcaaaatc 22320
 cacttctga actcaaatgc tctgttaaga gctttgagat tgacaaagga atttaccaga 22380
 cctctaattt cagggttgtt cctcaagag atgttgtagg attccctaac attacaaact 22440
 tgtgtccttt tggagaggtt tttaatgcta cttaattccc ttctgtctat gcatgggaga 22500
 ggaaaagaat ttctaattgt gttgctgatt actctgtgct ctacaactca acattttttt 22560
 caacctttaa gtgctatggc gtttctgcca ctaagttgaa tgatctttgc ttctccaatg 22620
 tctatgcaga ttcttttcta gtcaagggag atgatgtaag acaaatagcg ccaggacaaa 22680
 ctggtgttat tgetgattat aattataaat tgccagatga tttcatgggt tgtgtccttg 22740
 cttggaatac taggaacatt gatgctactt caactggtaa ttataattat aatataggt 22800
 atcttagaca tggcaagctt aggccctttg agagagacat atctaattgt cctttctccc 22860
 ctgatggcaa accttgacc ccacctgctc ttaattgtta ttggccatta aatgattatg 22920
 gtttttacac cactactggc attggctacc aaccttacag agttgtagta ctttcttttg 22980
 aacttttaaa tgcaccggcc acggtttgtg gaccaaaatt atccactgac cttattaaga 23040
 accagtgtgt caattttaat tttaatggac tcactggtac tgggtgtgta actccttctt 23100
 caaagagatt tcaaccattt caacaatttg gccgtgatgt ttctgatttc actgattccg 23160
 ttcgagatcc taaaacatct gaaatattag acatttcacc ttgctctttt ggggggtgta 23220
 gtgtaattac acctggaaca aatgcttcat ctgaagttgc tgttctatat caagatgta 23280
 actgcaactga tgtttctaca gcaattcatg cagatcaact cacaccagct tggcgcatat 23340
 attctactgg aaacaatgta ttccagactc aagcaggctg tcttatagga gctgagcatg 23400

tcgacacttc ttatgagtgc gacattccta ttggagctgg catttgtgt agttaccata 23460
 cagtttcttt attacgtagt actagccaaa aatctattgt ggcttatact atgtctttag 23520
 gtgctgatag ttcaattgct tactctaata acaccattgc tatacctact aacttttcaa 23580
 ttagcattac tacagaagta atgcctgttt ctatggctaa aacctccgta gattgtaata 23640
 tgtacatctg cggagattct actgaatgtg ctaatttgc tctccaatat ggtagctttt 23700
 gcacacaact aaatcgtgca ctctcaggta ttgctgtga acaggatcgc aacacacgtg 23760
 aagtgttcgc tcaagtcaaa caaatgtaca aaacccaac ttgaaagat tttggtggtt 23820
 ttaatttttc acaaatatta cctgaccctc taaagccaac taagaggctt tttattgagg 23880
 acttgcctt taataagggtg acactcgctg atgctggctt catgaagcaa tatggcgaat 23940
 gcctagggtga tattaatgct agagatctca ttgtgcgca gaagtcaat ggacttacag 24000
 tgttgccacc tctgctcact gatgatatga ttgtgccta cactgtgct ctagttagt 24060
 gtactgccac tgttgatgg acatttgggtg ctggcgctgc tcttcaaata cttttgcta 24120
 tgcaaatggc atataggttc aatggcattg gagttacca aaatgttctc tatgagaacc 24180
 aaaaacaaat cgccaaccaa ttaacaagg cgattagtca aattcaagaa tcacttaca 24240
 caacatcaac tgcattgggc aagctgcaag acgttgtaa ccagaatgct caagcattaa 24300
 acacacttgt taaacaactt agctctaatt ttggtgcaat ttcaagtgtg ctaaatgata 24360
 tcctttcgcg acttgataaa gtcgaggcgg aggtacaaat tgacaggta attacaggca 24420
 gacttcaaag cttcaaacc tatgtaacac aacaactaat cagggctgct gaaatcaggg 24480
 cttctgctaa tcttctgct actaaaatgt ctgagtgtgt tcttgacaa tcaaaaagag 24540
 ttgacttttg cggaaagggc taccacctta gtctctccc acaagcagcc ccgcatggtg 24600
 ttgtcttct acatgtcacg tatgtgccat cccaggagag gaacttcacc acagcgccag 24660
 caatttgta tgaaggcaaa gcatacttcc ctctgaagg tgtttttgtg tttaatggca 24720
 cttcttggtt tattacacag aggaacttct ttctccaca aataattact acagacaata 24780
 catttgcctc aggaatgtg gatgtcgtta ttggcatcat taacaacaca gtttatgatc 24840
 ctctgcaacc tgagcttgac tcattcaaag aagagctgga caagtacttc aaaaatcata 24900
 catcaccaga tgttgatctt ggcgacattt caggcattaa cgcttctgtc gtcaacattc 24960
 aagaagaaat tgaccgcctc aatgaggtcg ctaaaaattt aaatgaatca ctcatgacc 25020
 ttcaagaatt gggaaaatat gagcaatata ttaaatggcc ttggtatgtt tggctcggt 25080
 tcattgctgg actaatggc atcgtcatgg ttacaatctt gctttgttgc atgactagt 25140
 gttgcagttg cctcaagggt gcatgctctt gtggttctt ctgcaagtt gatgaggatg 25200
 actctgagcc agttctcaag ggtgtcaaat tacattacac ataacgaac ttatggattt 25260
 gtttatgaga tttttactc ttgatcaat tactgcacag ccagtaaaaa ttgacaatgc 25320
 ttctcctgca agtactgttc atgctacagc aacgataccg ctacaagcct cactccctt 25380
 cggatggctt gttattggcg ttgcatctt tctgttttt cagagcgcta ccaaataat 25440
 tgcgctcaat aaaagatggc agctagccct ttataagggc ttccagttca tttgcaattt 25500
 actgctgcta ttgttacca tctattcaca tcttttgcct gtcgctgcag gtatggaggc 25560
 gcaatttttg tacctctatg ccttgatata tttctacaa tgcacacac catgtagaat 25620
 tattatgaga tgttggtttt gttggaagt ccaatccaag aaccattac tttatgatgc 25680

caactacttt gtttgctggc acacacataa ctatgactac tgtataccat ataacagtgt 25740
 cacagataca attgtcgtta ctgcaggatga cggcatttca acaccaaaac tcaaagaaga 25800
 ctaccaaatt ggtgggttatt ctgaggattg gcactcaggt gttaaagact atgtcgttgt 25860
 acatggctat ttcaccgaag tttactacca gcttgagtct acacaaatta ctacagacac 25920
 tggattgaa aatgctacat tcttcatctt taacaagctt gttaaagacc caccgaatgt 25980
 gcaaatacac acaatcgacg gctcttcagg agttgcaaat ccagcaatgg atccaattta 26040
 tgatgagccg acgacgacta ctagcgtgcc tttgtaagca caagaaagtg agtacgaact 26100
 tatgtactca ttcgtttcgg aagaacagg tacgttaata gttaatagcg tacttctttt 26160
 tcttgctttc gtggtattct tgctagtac actagccatc cttactgcgc ttcgattgtg 26220
 tgcgtactgc tgcaatattg ttaacgtgag tttagtaaaa ccaacggttt acgtctactc 26280
 gcgtgttaaa aatctgaact ctctgaagg agttcctgat ctctcgttct aaacgaacta 26340
 actattatta ttattctggt tggaaactta acattgctta tcatggcaga caacgggtact 26400
 attaccgttg aggagcttaa acaactcctg gaacaatgga acctagtaat aggtttccta 26460
 ttcctagcct ggattatggt actacaattt gcctattcta atcggaacag gttttgtac 26520
 ataataaagc ttgttttctt ctggctcttg tggccagtaa cacttgcttg ctttgtgctt 26580
 gctgctgtct acagaattaa ttgggtgact ggccgggattg cgattgcaat ggcttgattt 26640
 gtaggcttga tgtggcttag ctacttcgtt gcttccttca ggctgtttgc tcgtaccgcg 26700
 tcaatgtggt cattcaacct agaacaacac attcttctca atgtgcctct ccgggggaca 26760
 attgtgacca gaccgctcat ggaaagtga cttgtcattg gtgctgtgat cattcgtggt 26820
 cacttgcgaa tggccggaca ctccctaggg cgctgtgaca ttaaggacct gccaaaagag 26880
 atcactgtgg ctacatcacg aacgctttct tattacaaat taggagcgtc gcagcgtgta 26940
 ggcactgatt caggttttgc tgcatacaac cgctaccgta ttggaaacta taaattaaat 27000
 acagaccacg ccggtagcaa cgacaatatt gctttgctag tacagtaagt gacaacagat 27060
 gtttcatctt gttgacttcc aggttacaat agcagagata ttgattatca ttatgaggac 27120
 tttcaggatt gctatttggg atcttgacgt tataantaagt tcaatagtga gacaattatt 27180
 taagcctcta actaagaaga attattcgga gttagatgat gaagaaccta tggagttaga 27240
 ttatccataa aacgaacatg aaaattattc tcttcctgac attgattgta ttacatctt 27300
 gcgagctata tcactatcag gagtgtgita gaggtacgac tgtactacta aaagaacctt 27360
 gcccatcagg aacatacagg ggcaattcac catttcaccc tcttgctgac aataaattg 27420
 cactaacttg cactagcaca cactttgctt ttgcttgctg tgacgggtact cgacatacct 27480
 atcagctgcg tgcaagatca gtttcaccaa aacttttcat cagacaagag gaggttcaac 27540
 aagagctcta ctcgccactt tttctcattg ttgctgctct agtattttta atactttgct 27600
 tcaccattaa gagaagaca gaatgaatga gctcacttta attgacttct atttgtgctt 27660
 tttagccttt ctgctattcc ttgttttaaat atgcttatt atattttggt tttcactcga 27720
 aatccaggat ctagaagaac cttgtaccaa agtctaacg aacatgaaac ttctcattgt 27780
 tttgacttgt atttctctat gcagttgcat acgcactgta gtacagcgct gtgcatctaa 27840
 taaacctcat gtgcttgaag atccttgctc tactggttac caacctgaat ggaatataag 27900
 gtacaacact aggggtaata cttatagcac tgcttggtt tgtgctctag gaaaggtttt 27960

accctttcat agatggcaca ctatggttca aacatgcaca cctaattgta ctatcaactg 28020
 tcaagatcca gctggtggig cgcttatagc taggtgttgg taccttcatg aaggtcacca 28080
 aactgctgca tttagagacg tatttgttgt tttaaataaa cgaacaaatt aaaatgtctg 28140
 ataatggacc ccaatcaaac caacgtagtg cccccgcat tacatttggg ggaccacag 28200
 attcaactga caataaccag aatggaggac gcaatggggc aaggccaaaa cagcgccgac 28260
 cccaagggtt acccaataat actgcgtctt ggttcacagc tctcactcag catggcaagg 28320
 aggaacttag attccctcga ggccaggcg cgccagggcg ttccaatcaa caccaatagt ggtccagatg 28380
 accaaattgg ctactaccga agagctaccc gacgagttcg tgggtgtgac ggcaaatga 28440
 aagagctcag cccagatagg tacttctatt acctaggaac tggcccagaa gcttcacttc 28500
 cctacggcgc taacaagaa ggcacgtat gggttgcaac tgaggagacc ttgaatacac 28560
 ccaaagacca cattggcacc cgcaatccta ataacaatgc tgccaccgtg ctacaacttc 28620
 ctcaaggaa aacattgcc aaggttct acgcagaggg aagcagaggc ggcagtcaag 28680
 cctcttctcg ctctcatca cgtagtcg cgtaattcaag aaattcaact cctggcagca 28740
 gtaggggaaa ttctcctgct cgaatggcta gcggagggtg tgaaactgcc ctgcgctat 28800
 tgtgctaga cagattgaac cagcttgaga gcaaagtctc tggtaaaggc caacaacaac 28860
 aaggccaaac tgtcactaag aaatctgctg ctgaggcatc taaaaagcct cgccaaaaac 28920
 gtactgccac aaaacagtac aacgtcactc aagcatttgg gagacgtggt ccagaacaaa 28980
 cccaaggaaa tttcggggac caagacctaa tcagacaagg aactgattac aaacattggc 29040
 cgcaaattgc acaatttgc ccaagtgcct ctgcattctt tggaatgtca cgatttgga 29100
 tggagtcac accttcggga acatggctga cttatcatgg agccattaaa ttggatgaca 29160
 aagatccaca attcaagac aacgtcatac tgctgaacaa gcacattgac gcatacaaaa 29220
 cattcccacc aacagagcct aaaaaggaca aaaagaaaaa aactgatgaa gctcagcctt 29280
 tgccgcagag acaaaagaag cagcccactg tgactcttct tcctgcgct gacatggatg 29340
 atttctccag acaacttcaa aattccatga gtggagcttc tgctgattca actcaggcat 29400
 aaacactcat gatgaccaca caaggcagat gggctatgta aacgttttcg caattccgtt 29460
 tacgatacat agtctactct tgtgcagaat gaattctcgt aactaaacag cacaagtagg 29520
 tttagttaac tttaatctca catagcaatc tttaatcaat gtgtaacatt agggaggact 29580
 tgaagagcc accacatttt catcgaggcc acgcggagta cgatcgaggg tacagtgaat 29640
 aatgctaggg agagctgcct atatggaaga gccctaattgt gtaaaattaa ttttagtagt 29700
 gctatcccca tgtgatttta atagcttctt aggagaatga caaaa 29745

<210> 3

<211> 29

<212> RNA

<213> SARS冠状病毒

<400> 3

cctactggtt accaacctga atggaatat

29

说明书附图

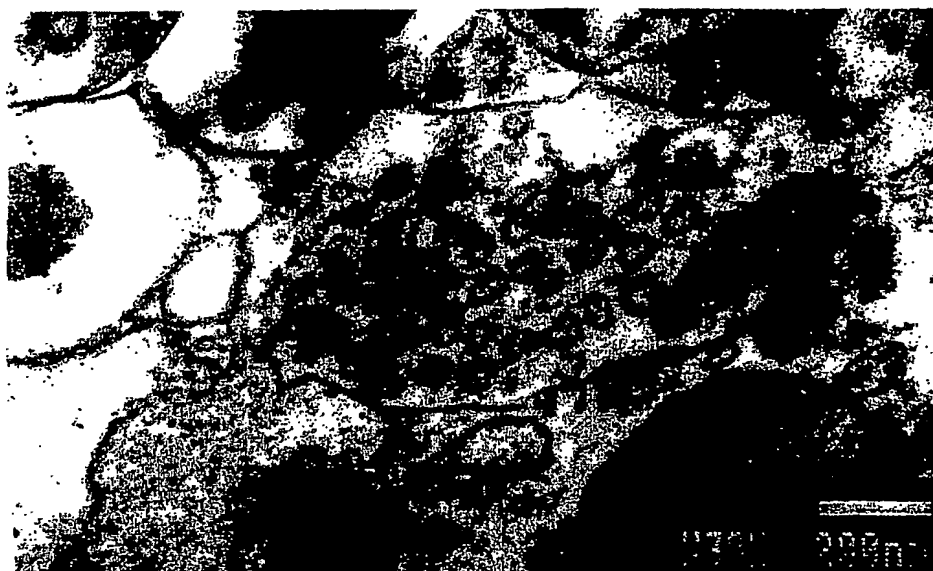


图1

MCLKILVRYNTRGNTYSTAWLCALGKVLFFHRWHTMVQTCTPNVTINCQDPAGGALIARCWYLHEGHQTAAFRDVLVVLNKRTN* TOR2
 MCLKILVRYNTRGNTYSTAWLCALGKVLFFHRWHTMVQTCTPNVTINCQDPAGGALIARCWYLHEGHQTAAFRDVLVVLNKRTN* CUHK-Su10
 MCLKILVRYNTRGNTYSTAWLCALGKVLFFHRWHTMVQTCTPNVTINCQDPAGGALIARCWYLHEGHQTAAFRDVLVVLNKRTN* HKU-39849
 MCLKILVRYNTRGNTYSTAWLCALGKVLFFHRWHTMVQTCTPNVTINCQDPAGGALIARCWYLHEGHQTAAFRDVLVVLNKRTN* Urbani
 MCLKILVRYNTRGNTYSTAWLCALGKVLFFHRWHTMVQTCTPNVTINCQDPAGGALIARCWYLHEGHQTAAFRDVLVVLNKRTN* TW1
 MCLKILVRYNTRGNTYSTAWLCALGKVLFFHRWHTMVQTCTPNVTINCQDPAGGALIARCWYLHEGHQTAAFRDVLVVLNKRTN* SIN2677
 MCLKILVRYNTRGNTYSTAWLCALGKVLFFHRWHTMVQTCTPNVTINCQDPAGGALIARCWYLHEGHQTAAFRDVLVVLNKRTN* SIN2774
 MCLKILVRYNTRGNTYSTAWLCALGKVLFFHRWHTMVQTCTPNVTINCQDPAGGALIARCWYLHEGHQTAAFRDVLVVLNKRTN* SIN2500
 MCLKILVRYNTRGNTYSTAWLCALGKVLFFHRWHTMVQTCTPNVTINCQDPAGGALIARCWYLHEGHQTAAFRDVLVVLNKRTN* SIN2748
 MCLKILVRYNTRGNTYSTAWLCALGKVLFFHRWHTMVQTCTPNVTINCQDPAGGALIARCWYLHEGHQTAAFRDVLVVLNKRTN* SIN2679
 MCLKILVRYNTRGNTYSTAWLCALGKVLFFHRWHTMVQTCTPNVTINCQDPAGGALIARCWYLHEGHQTAAFRDVLVVLNKRTN* BJ01
 MCLKILVRYNTRGNTYSTAWLCALGKVLFFHRWHTMVQTCTPNVTINCQDPAGGALIARCWYLHEGHQTAAFRDVLVVLNKRTN* BJ03
 MCLKILVRYNTRGNTYSTAWLCALGKVLFFHRWHTMVQTCTPNVTINCQDPAGGALIARCWYLHEGHQTAAFRDVLVVLNKRTN* BJ02
 MCLKILVRYNTRGNTYSTAWLCALGKVLFFHRWHTMVQTCTPNVTINCQDPAGGALIARCWYLHEGHQTAAFRDVLVVLNKRTN* BJ04
 MCLKILVRYNTRGNTYSTAWLCALGKVLFFHRWHTMVQTCTPNVTINCQDPAGGALIARCWYLHEGHQTAAFRDVLVVLNKRTN* CUHK-W1
 MCLKILVLLVTNLNGI*GTTLGVLIALLGFL* GZ01
 MCLKILVLLVTNLNGI*GTTLGVLIALLGFL* GZ02102003

图 2B

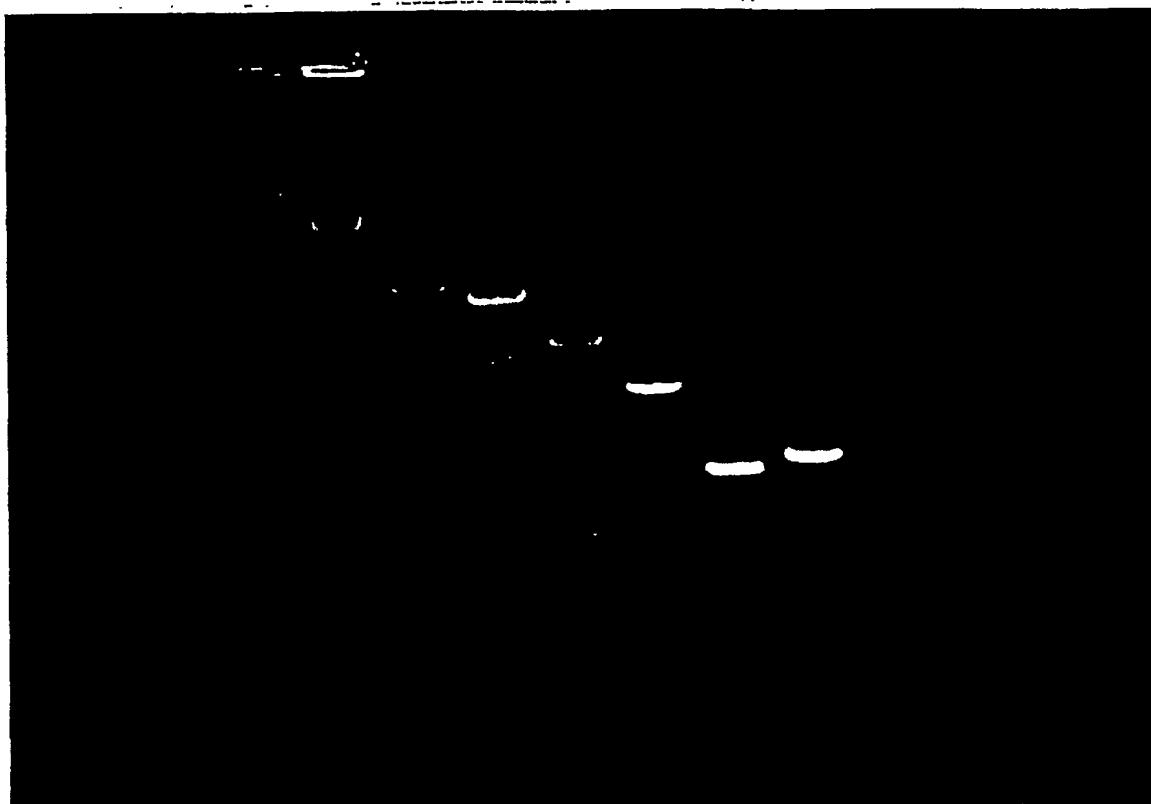


图 3

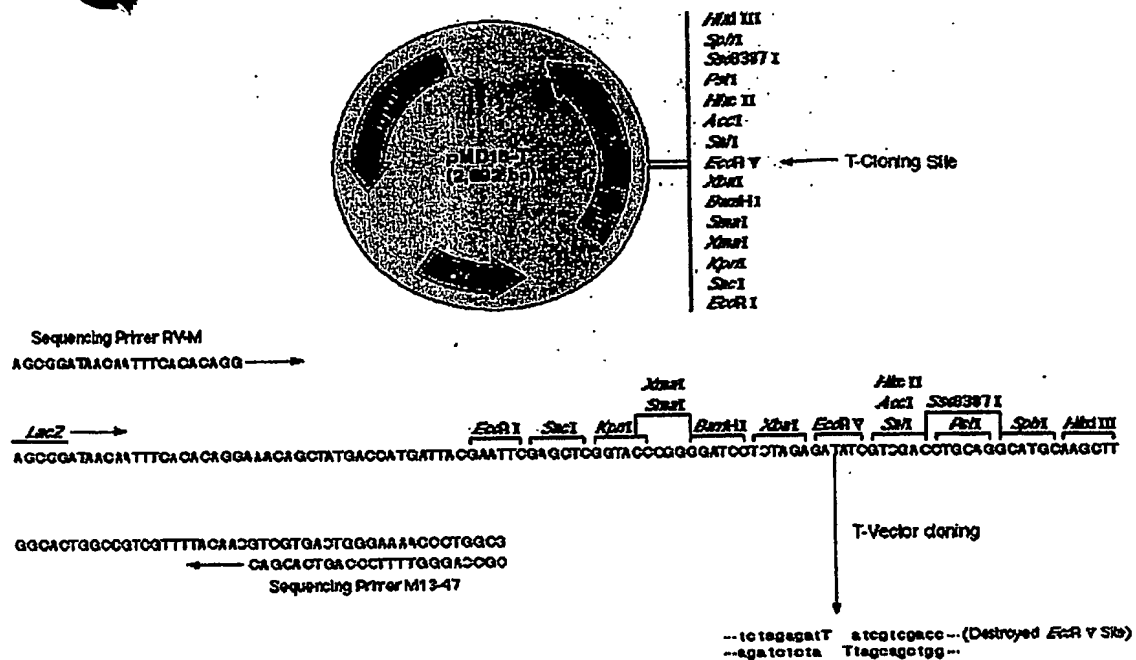
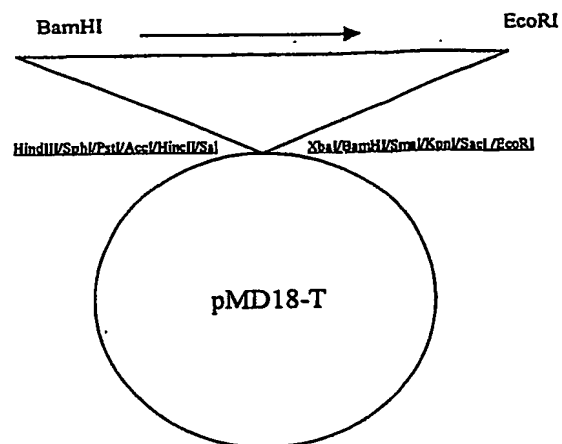
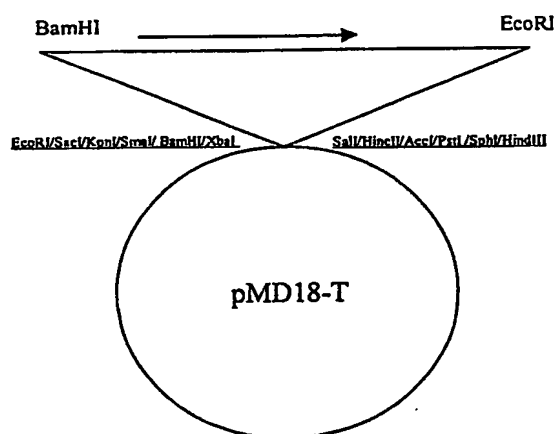


图 4

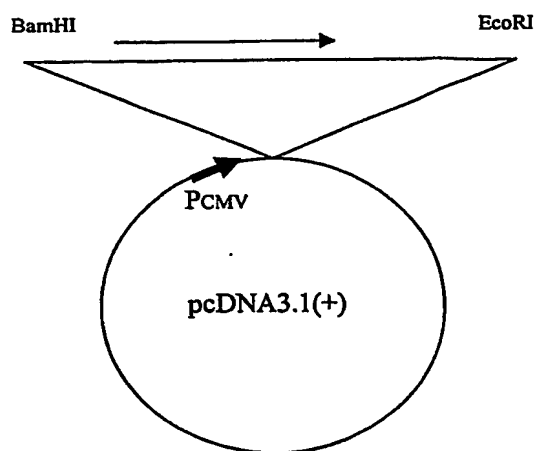


S1、S2、E、M 和 N 克隆示图

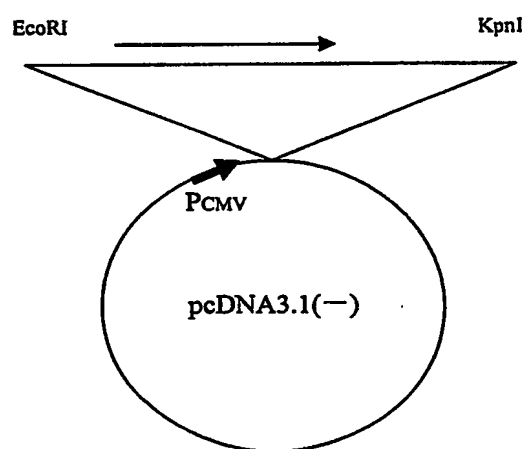


X2 pMD18-T 克隆示图

图 5



S1、S2、E、M pcDNA3.1 克隆示意图



X2 pcDNA3.1(-)克隆示意图

图 7

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.